

Isolering og identifisering av bioaktive substanser fra den
afrikanske medisinsplanter
Zanthoxylum heitzii
og studier av toksisitet på malariamyggen,
Anopheles gambiae

Nastaran Moussavi



Masteroppgave for graden:

Master i farmasi

Farmakognosi
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2014

Master i farmasi



Forfatter:

Nastaran Moussavi

Veiledere:

Helle Wangenstein

Karl Egil Malterud

Utført ved:

Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO

&

Le laboratoire Lutte contre les insectes nuisibles (LIN)
Institut de recherche pour le développement (IRD)
IRD MONTPELLIER



UiO : Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

© Nastaran Moussavi

2014

Isolering og identifisering av bioaktive substanser fra den afrikanske medisiplanten
Zanthoxylum heitzii og studier av toksisitet på malariamygg, *Anopheles gambiae*

Nastaran Moussavi

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Zanthoxylum heitzii (Aubrév. & Pellegr.) P.G Waterman er et tre som vokser i vest- og sentral Afrika. Det brukes til medisinske formål, blant annet mot malaria. Det er tidligere vist at et heksanekstrakt av barken fra denne planten dreper kakerlakker og snutebiller. I et pilotforsøk er det vist at ekstraktet dreper *Anopheles gambiae*-mygg, som er bærer av malariaprotozoen.

I denne oppgaven er alkaloidene dihydronitidin, isoarnottianamid, rhoifolin B og turraeanthin A isolert fra et heksanekstrakt av *Z. heitzii* bark. I tillegg er amidet pellitorin, lignanet sesamin, sesquiterpenet caryofyllenoksid og triterpenet isobauerenol isolert. Stoffene ble isolert ved kromatografiske metoder som kolonnekromatografi (VersaFlash), sentrifugalt akseletert tynnsjiktiskromatografi (CA-TLC) og preparativ HPLC. Alle forbindelsene ble strukturoppklart ved NMR-spektroskopi. Sesamin er tidligere kjent i planten, mens alle de andre er nye for *Z. heitzii*. Dihydronitidin, pellitorin, sesamin og caryofyllenoksid var hovedsubstansene. Ingen av forbindelsene som ble funnet er nye naturstoffer, men rhoifolin B og turraeanthin A er svært sjeldne.

Toksisitet av stoffene ble testet på rekelarver (*Artemia salina*), mygglarver og voksne hunnmygg (*Anopheles gambiae*).

I rekelarvetestene viste pellitorin toksiske egenskaper med en LD₅₀-verdi på mellom 1 og 10 µg/ml. Caryofyllenoksid og sesamin hadde også toksiske effekter, men svakere.

Dihydronitidin, isobauerenol og isoarnottianamid var ikke toksiske for rekelarver.

Heksanrækstraktet var toksisk med en LD₅₀-verdi 25±16 µg/ml. Andre ekstrakter av bark (etylacetat, etanol) og ekstrakter av andre plantedeler (frø og blad) var ikke toksiske.

Pellitorin var toksisk for voksne *A. gambiae*-hunnmygg. LD₅₀ var 68±38 ng/mygg. Caryofyllenoksid, dihydronitidin og sesamin var ikke toksiske. En blanding av pellitorin, caryofyllenoksid, dihydronitidin og sesamin i samme mengdeforhold som i rækstraktet hadde en LD₅₀-verdi på 39±14 ng/mygg. Pellitorin var også toksisk for *A. gambiae*-mygglarver og LD₅₀ var 14±1 µg/ml. Caryofyllenoksid var svakt toksisk (LD₅₀ 174±33 µg/ml) og sesamin var ikke toksisk. Dihydronitidin kunne ikke testes på rekelarver på grunn av dårlig løselighet i mediet. De andre stoffene var ikke tilgjengelige i store nok mengder for testing.

I denne oppgaven er det funnet åtte stoffer i heksanekstraktet av *Z. heitzii* bark. Syv av disse er ikke tidligere kjent i planten. Heksan barkekstraktet var toksisk for rekelarver. Andre barkekstrakter og ekstrakter av andre plantedeler var ikke aktive. Pellitorin var det mest aktive renstoffet i toksisitetstester på rekelarver, mygglarver og voksen mygg.

Forord

Jeg vil rette en stor og varm takk til mine hovedveiledere Helle Wangensteen og Karl Egil Malterud som har bidratt med gode og nyttige innspill underveis. Helle har hele tiden gitt meg klare og gode råd, og jeg setter pris på de gode samtalene vi har hatt oss imellom. Karls entusiasme for faget har vært en stor inspirasjonskilde. Jeg føler meg ekstremt heldig som fikk muligheten til å jobbe med en levende legende innen farmakognosifeltet.

Varme tanker sendes også til alle på IRD-laboratoriet i Montpellier, Frankrike. Dere tok meg godt i mot og her fikk jeg en god plattform for selvstendig arbeid med en god dose praktisk entomologisk læring. Allez allez!

Det har videre vært en fornøyelse for meg å ta del i det sammensveisede miljøet på avdelingen farmakognosi. Jeg kommer til å savne alle de fine stundene vi delte sammen både på laboratoriet og lunsjrommet. Lenge leve Mövenpick!

Min sjelevenn, Mats Wilhelmsen, hadde jeg aldri vært foruten.

Oslo, Juni 2014

Nastaran Moussavi

Hensikt

Hensikten med oppgaven:

- Å isolere, strukturoppklare og identifisere biologisk aktive lavmolekylære substanser fra barken av *Zanthoxylum heitzii*.
- Som et ledd i en bredere kartlegging av planteekstraktenes, fraksjonenes og renstoffenes biologiske aktivitet, var det av interesse å utføre bioassaystudier mot malariamygge og mygglarver (*Anopheles gambiae*) *in vivo*. Det er tidligere rapportert at barken brukes mot denne myggen i sentral-Afrika, og det ville være av interesse å finne ut om det er en sammenheng mellom tradisjonell bruk og vitenskapelige resultater.
- Som en generell toksisitetstest var det ønsket å teste virkning på rekelarver (*Artemia salina*).

Ved å dokumentere effekten kan man bedre veilede lokalbefolkningen til å bruke medisiplanten på en hensiktsmessig måte. I mange land er det dårlig tilgang på kommersielle legemidler, og det vil ofte være nødvendig å ty til lokale ressurser.

I tillegg kan studiene muligens bidra til utvikling av et nytt antimalaria agens enten i form av insekticid eller legemiddel.

Fortkortelser

APT	Attached proton test
AU	Absorbance units
^{13}C	Karbon-13
CA-TLC	Sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi
CDCl_3	Deuterert kloroform
COSY	Correlation Spectroscopy
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
EtOAc	Etylacetat
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
H	HPLC-kromatografering
^1H	Hydrogen
K	Kromatotron, CA-TLC
LD_{50}	Konsentrasjon som gir 50 % dødelighet
Kongo	Republikken Kongo
MSIS	Meldesystemet for Infeksjonssykdommer
NMR	Nukleær magnetisk resonans
Ppm	parts per million

SD	Standardavvik
TLC	Tynnsjiktskromatografi /Thin layer Chromatography
TMS	Tetrametylsilan
V	Versaflash kolonne separasjon
WHO	World Health Organisation / Verdens helseorganisasjon

Innhold

1	Bakgrunn	1
1.1	<i>Zanthoxylum heitzii</i>	1
1.1.1	Taksonomisk klassifisering	1
1.1.2	Synonymer	1
1.1.3	Botaniske forhold	1
1.1.4	Habitat	2
1.1.5	Tradisjonell bruk	2
1.1.6	Tidligere studier	3
1.2	Malaria.....	7
1.2.1	Om sykdommen	7
1.2.2	Etiologi	7
1.2.3	Epidemiologi	8
1.2.4	Risikogrupper	8
1.2.5	Symptomer	9
1.2.6	Patogenese	10
1.2.7	Dagens behandlingsalternativer	12
1.2.8	Dagens malariasituasjon.....	13
1.3	Mygg.....	14
1.3.1	Tovinger (Diptera).....	14
1.3.2	Stikkemygg (Culicidae).....	14
1.3.3	<i>Anopheles</i> -mygg.....	17
1.3.4	Myggens livssyklus	18
1.4	Rekelarver (Brine shrimps).....	20
2	Materialer	21
2.1	Kjemikalier	21
2.2	Apparatur	22
3	Metoder	25
3.1	Generelle metoder.....	25
3.1.1	Innveiging.....	25
3.1.2	Vannkvalitet	25
3.2	Separasjonsmetoder	25

3.2.1	Ekstraksjon med organiske løsemidler.....	25
3.2.2	Kolonnekromatografi med forhøyet trykk	25
	VersaFlash kolonne separasjon	25
3.2.3	Høytrykksvæskeskromatografi (HPLC)	27
3.2.4	Kromatotron (CA-TLC)	30
3.3	Identifikasjonsmetoder	32
3.3.1	Analytisk tynnsjikt skromatografi (TLC).....	32
3.3.2	Nukleær magnetisk resonans spektroskopi (NMR)	35
3.4	Metoder for måling av biologisk aktivitet	39
3.4.1	Rekelarvetest (Brine shrimp lethality assay).....	39
3.4.2	Testing på <i>Anopheles</i> -mygg	42
4	Eksperimentell utførelse.....	48
4.1	Kjemiske studier	48
4.1.1	Generell utførelse	48
4.1.2	Plantemateriale	48
4.1.3	Ekstraksjon av plantemateriale.....	48
4.1.4	Fraksjonering av heksanræ ekstraktet	49
4.1.5	Fraksjonering av fraksjon V3	49
4.1.6	Fraksjonering av fraksjon V3V2	50
4.1.7	Fraksjonering av fraksjon V3V6	50
4.1.8	Fraksjonering av fraksjon V4 og V5 supernatant.....	51
4.1.9	Fraksjonering av fraksjon V4-V5 supernatant V4	52
4.1.10	Fraksjonering av fraksjon V4-5 supernatant V5	52
4.1.11	Fraksjonering av fraksjon V6 og V7	53
4.1.12	Fraksjonering av fraksjon V6-7V2.....	53
4.1.13	Fraksjonering av fraksjon V6-7V2V4.....	54
4.1.14	Fraksjonering av fraksjon V6-7V2V5	54
4.1.15	Fraksjonering av fraksjon V6-7V9.....	55
4.1.16	Fraksjonering av fraksjon V9 og V10	55
4.1.17	Fraksjonering av fraksjon V14	56
4.1.18	Fraksjonering av fraksjon V14V7	57
4.1.19	Fraksjonering av fraksjon V14V8	57
4.2	Analytisk HPLC	59

4.3	Preparativ HPLC.....	60
4.4	Biologiske studier	62
4.4.1	Bioassay - Toksisitetsstudier på rekellarver (<i>Artemia salina</i>).....	62
4.4.2	Bioassay – Toksisitetsstudier på malariamygg (<i>Anopheles gambiae</i>)	64
5	Resultater.....	66
5.1	Kjemiske studier	66
5.1.1	Analytisk og preparativ HPLC	87
5.2	Biologiske studier	93
5.2.1	Toksisitet på rekellarver (Brine shrimp lethality essay).....	93
5.3	Toksisitet på voksne hunmygg, <i>Anopheles gambiae</i>	100
5.3.1	Topikal myggtest.....	100
5.3.2	Toksisitet på larver av <i>Anopheles gambiae</i>	105
6	Diskusjon.....	108
6.1	Kjemiske studier	108
6.2	Biologisk aktivitet.....	110
6.2.1	Toksisitet på rekellarver	110
6.2.2	Toksisitet på voksne hunmygg, <i>Anopheles gambiae</i>	112
6.2.3	Toksisitet på larver av <i>Anopheles gambiae</i>	114
7	Forslag til videre arbeid.....	115
8	Konklusjon	116
9	Vedlegg	117
9.1	Kromatografi	118
9.2	Flytskjemaer	134
9.2.1	Flytskjema 1	134
9.2.2	Flytskjema 2	135
9.2.3	Flytskjema 3	136
9.2.4	Flytskjema 4	137
9.2.5	Flytskjema 5	138
9.2.6	Flytskjema 6	139
9.2.7	Flytskjema 7	140
9.2.8	Flytskjema 8	141
9.2.9	Flytskjema 9	142
9.2.10	Flytskjema 10	143

9.2.11	Flytskjema 11	144
9.2.12	Flytskjema 12	145
9.2.13	Flytskjema 13	146
9.2.14	Flytskjema 14	147
9.2.15	Flytskjema 15	148
9.3	NMR-spektre	149
9.4	Analytiske HPLC-kromatogrammer.....	162
9.4.1	Fraksjon V3V9	162
9.4.2	Fraksjon V6-7V9K4	163
9.4.3	Fraksjon V14V7K4	164
Litteraturliste		165

Tabell 1.	Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i <i>Zanthoxylum heitzii</i>	3
Tabell 2.	Sykdommer som overføres av moskitoer og andre bitende Diptera (Kilde: WHO: Mosquitos and other biting Diptera[36].	16
Tabell 3.	Tabellen viser klassifisering av mygg som levende, halvdød eller død i bioassays [48].	42
Tabell 4.	Gradientsystem for analytisk HPLC.	59
Tabell 5.	Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon V6-7V9K4-5, V3V9-10 og V14V8K3+V14V7K4-5.	61
Tabell 6.	Utbytte ved ekstraksjon av <i>Z. heitzii</i> bark.....	66
Figur 2.	Kromatograferingsprofil for kolonnekromatografi av <i>Z. heitzii</i> heksan råekstrakt....	67
Figur 3.	Caryofyllenoksid	67
Tabell 7.	Caryofyllenoksid ¹ H NMR-data.....	68
Tabell 8.	Caryofyllenoksid ¹³ C (APT)-data.	68
Tabell 10.	Dihydronitidin ¹³ C (APT)-data.	70
Figur 5.	Isobauerenol.....	72
Tabell 11.	Isobaureneol. ¹ H NMR-spektraldata.	72
Tabell 12.	Isobauerenol ¹³ C (APT)-data.....	73
Figur 6.	Sesamin.....	75
Tabell 13.	Sesamin ¹ H NMR-data.....	76
Tabell 14.	Sesamin ¹³ C (APT) NMR-data	76
Figur 7.	Pellitorin	77
Tabell 15.	Pellitorin ¹ H NMR-data.....	77
Tabell 16.	Pellitorin ¹³ C (APT) NMR-data	78
Figur 7.	Rhoifolin B	79
Tabell 17.	Rhoifolin B ¹ H NMR-data	79
Tabell18.	Rhoifolin B ¹³ C (APT) NMR-data	80
Figur 9.	Turraeanthin A.....	81

Tabell 19. Turraeanthin A ^{13}C (APT) NMR-data.....	82
Tabell 20. Turraeanthin A ^{13}C (APT) NMR-data.....	83
Figur 9. Isoarnottianamid	84
Tabell 21. Isoarnottianamid ^1H NMR spektrum.	85
Tabell 22. Isoarnottianamid ^{13}C (APT) NMR spektrum.	86
Tabell 23. Identifikasjon av stoffer fra preparativ HPLC av fraksjon V6-7V9K4-5. Alle fraksjonene veide 1 mg eller mindre.	88
Tabell 24. Identifikasjon av stoffer fra preparativ HPLC av fraksjon v3v9-10.	89
Tabell 25. Identifikasjon av stoffer fra preparativ HPLC av fraksjon v14v8c3+v14v7c4-5. Alle fraksjonene veide 1 mg eller mindre.	91
Tabell 26. Toksisitet av forskjellige ekstrakter av ulike plantedeler av <i>Z. heitzii</i> og av positiv kontroll (podofyllotoksin). For positiv kontroll er bare en konsentrasjon målt.	93
Figur 11. Toksisitet på rekellarver av <i>Z. heitzii</i> heksan barkekstrakt (vist som % overlevelse) 94	
Tabell 27. Toksisitet av renstoffer fra <i>Z. heitzii</i> og av positiv kontroll (podofyllotoksin). For positiv kontroll er bare en konsentrasjon målt. Pellitorin er målt ved andre konsentrasjoner enn de andre stoffene.....	96
Figur 12. Toksisitet av caryofyllenoksid på rekellarver (vist som % overlevelse).	96
Figur 13. Toksisitet av sesamin på rekellarver (vist som % overlevelse).	97
Figur 14. Toksisitet av pellitorin på rekellarver (vist som % overlevelse).	98
Figur 15. Dødelighet av permetrin på <i>A.gambiae</i> hunnmygg.....	100
Figur 16. Toksisitet av pellitorin på voksne hunner av <i>A. gambiae</i> . R^2 verdi er vist for lineærregresjon.	102
Figur 17. Toksisitet av blanding av caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin på voksne hunner av <i>A. gambiae</i> . Kurvetilpasning som 4. ordens polynom.	103
Figur 18. Øvre kurve (linearitet: $R^2 = 0.9418$) er for blanding av caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin, nedre kurve (linearitet: $R^2 = 0.9672$) er for pellitorin alene. Både blanding og pellitorin dreper hunnmygg, men blandingen av renstoffer har en høyere aktivitet.....	103
Tabell 28. Pellitorin og blanding (4 % caryofyllenoksid, 31 % dihydronitidin, 26 % sesamin, 39 % og pellitorin) viser aktivitet og dreper <i>Anopheles gambiae</i> -hunnmygg.....	104
Figur 19. Larvicid effekt av caryofyllenoksid. Kurvetilpasning som 4. ordens polynom.	105
Figur 20. Dødelighet av pellitorin for <i>A. gambiae</i> mygglarver. R^2 verdi er vist for lineær regresjon.	106
Figur 21. Pellitorin (venstre kurve) og caryofyllenoksid (høyre kurve) dreper mygglarver, men pellitorin har mye høyere aktivitet. Sesamin (ikke vist) har omtrent samme effekt som caryofyllenoksid.	107

1 Bakgrunn

1.1 *Zanthoxylum heitzii*

1.1.1 Taksonomisk klassifisering

Systematikk for *Zanthoxylum heitzii* er beskrevet som følger [1]:

Rike:	Plantae
Subrike:	Tracheobionta
Superdivisjon:	Spermatophyta
Divisjon:	Magnoliophyta
Klasse:	Magnoliopsida
Subklasse:	Rosidae
Orden:	Sapindales
Familie:	Rutaceae
Slekt:	<i>Zanthoxylum</i> L.
Art:	<i>Zanthoxylum heitzii</i> (Aubrév. & Pellegr.) P.G. Waterman

1.1.2 Synonymer

Synonymer for denne planten er *Fagara heitzii* Aubrév. & Pellegr. [2] og *Fagara brieyi* Vermoesen ex G.C.C. Gilbert [3]. Lokalt kalles denne planten olon [4], mens i distriktet Lekoumou i Republikken Kongo er den bedre kjent som bouboulou [5].

1.1.3 Botaniske forhold

Zanthoxylum heitzii er et forholdsvis stort tre og kan i enkelte tilfeller bli 35 meter høyt. Trestammen, som kan bli opp til 1,5 meter i diameter, er uten grener de første 20 meterne.

Stammen er glatt til litt oppsprukket og hos gamle trær kan den også være skjellede. Barken har en grå til grønlig farget utside med en gulbrun og oransjespettet innside. I tillegg er barken utsmykket med pigger som kan bli opp til 9 cm lange, men eldre trær kan mangle disse.

Bladene vokser samlet på enden av grenene. Selve bladet er ulikefinnet og består av mellom 25-51 småblader. Småbladet har en avlang fasong og tuppen er kort og lansettformet. Det sammensatte bladet kan bli opptil 1 meter langt. Blomsterstandene er utformet som klaser hvor blomstene sitter endestilt eller langsmed blomsterstilken, som for øvrig kan bli opptil 40 cm lang. Frøene er svarte, blanke, kuleformede og omtrent 2,5 mm i diameter. *Z. heitzii* er et tre som vokser raskt. Fugler bidrar antakeligvis til majoriteten av frøspredningen [4].



Figur a. Fra venstre: *Zanthoxylum heitzii* blad, frø og bark.

1.1.4 Habitat

Slekten *Zanthoxylum* forekommer i tropiske områder over hele verden. Totalt består slekten av over 200 arter der brorparten av disse finnes i det tropiske beltet gjennom Amerika. På det afrikanske fastlandet finnes det omlag 35 ulike arter innen *Zanthoxylum*-slekten.

Arten *Z. heitzii* er et tre som vokser i de sentrale deler av det afrikanske kontinentet. Dets habitat strekker seg hovedsakelig fra sørlige områder av Kamerun og Den sentralafrikanske republikk og videre sørover til Gabon og ned til provinsen Bas-Congo i Den demokratiske republikken Kongo[4].

1.1.5 Tradisjonell bruk

Z. heitzii har flere bruksområder både innen tradisjonell medisin og agrikultur i de sentralafrikanske landene nevnt i ovenstående avsnitt.

Medisinplanten benyttes ved flere ulike indikasjoner i Kongo. Her utnyttes barken som analgetikum, blant annet for å lindre tannpine [6]. I tillegg brukes planten tradisjonelt som

fiskegift. Bønder velger gjerne å beholde treet etter avskoging til jordbruk, for å skape tilstrekkelig skygge for avlingene av kaffe- eller kakaoplanter.

I Kamerun skrapes barken fra treet og benyttes topikalt i behandling mot malaria. Videre har barken blitt anvendt mot andre indikasjoner som gonoré, byller, smertefulle ledd og seksuell impotens hos menn [4, 7].

Barken har imidlertid andre indikasjonsområder i Gabon. I dette kystlandet har den blitt rapportert brukt som behandling mot revmatisme og stivhet. Et brygg av kvister fra treet i sitronsaft benyttes også for å behandle hjerteproblemer [4].

1.1.6 Tidligere studier

Det er gjort forholdsvis få studier på *Z. heitzii*. De naturvitenskapelige studiene ble først igangsatt på 1980-tallet. I dag har arbeidet resultert i identifikasjon og strukturoppklaring av flere innholdsstoffer fra både rot og hovedsakelig bark. Selv om noen biologiske effekter allerede er dokumentert for denne planten, er behovet for ytterligere studier absolutt tilstede.

Identifiserte innholdsstoffer

I tabell 1 er det listet forbindelser som tidligere er isolert og identifisert fra *Z. heitzii*. Forbindelsene er sortert etter kjemisk stoffgruppe. Plantedelen forbindelsen er isolert fra, samt en kildehenvisning til hver enkelt forbindelse, er også oppgitt. Fytokjemiske screeninger av *Z. heitzii*-ekstrakter avdekker tilstedeværelse av blant annet alkaloider, fenoler, saponiner og planteslim [8]. Flavonoider er funnet i alle plantedeler unntatt i rot [9].

Tabell 1. Oversikt over identifiserte innholdsstoffer i *Zanthoxylum heitzii*

Kjemisk stoffgruppe	Molekylforbindelse	Plantedel	Kilde
<i>Alkaloider</i>	Arnottianamid	Bark	[10]
	Fagaramid	Bark	[10, 11]
	Flindersin	Kjerneved	[12]

	Iso- γ -fagarin	Bark	[10]
	Iso- γ -skimmianin	Bark, rot	[10]
	6-Metylnitidin	Rot	[13]
	Nitidin	Bark	[11]
	Skimmianin	Bark	[13]
Amider	Heitziamid A	Bark	[10]
	Heitziamid B	Bark	[10]
Aromatiske fettsyreestere	Heitzietanoid A	Bark	[10]
	Heitzietanoid B	Bark	[10]
Ikke-aromatiske fettsyreestere	Metyl heksatriacontanoat	Bark	[10]
	Metyl tetracontanoat	Bark	[10]
Lignaner	Sesamin	Bark	[10, 11]
	Savinin	Bark	[10, 11]
	Arctigenin metyleter	Bark	[10, 11]
	<i>meso</i> -2,3-Bis(3,4,5-trimetoksybenzyl)-1,4-butandiol	Bark	[11]
	4-Acetoksy-2,3-bis(3,4,5-trimetoksybenzyl)-1-butanol	Bark	[11]
	2-(3',4'-Dimetoksybenzyl)-3-(3'',4'',5''-trimetoksybenzyl)- γ -butyrolakton	Bark	[10]

Steroler	Campesterol	Bark	[11]
	β -Sitosterol	Bark, rot	[10, 13]
	Stigmasterol	Bark	[10]
	Stigmasterol-3-O- β -D-glucopyranosid	Bark	[10]
Triterpener	Lupeol	Bark, rot	[13]
	Lupeon	Bark, rot	[10, 13]

Biologisk aktivitet

- **Cytotoksisk aktivitet**

Metanolekstrakt av både frukt og bark fra *Z. heitzii* er blitt testet på flere ulike humane cancercellelinjer, og aktivitet overfor tumorcellene er vist hos begge ekstraktene. Felles for disse ekstraktene er observert cytotoksisk aktivitet på brystkarsinomer (MCF-7). Fruktekstraktet har vist seg å ha størst veksthemmende effekt på prostatakarsinom cellelinjer (PC-3). Barkekstraktet var imidlertid mest potent og viste signifikante antiproliferative egenskaper med veksthemmende aktivitet på akutte monocytiske leukemi-cellelinjer (THP-1) og cervikalt karsinom (HeLa) [14].

- **Antimikrobiell aktivitet**

Et metanolekstrakt av bark fra *Z. heitzii* er vist å ha noe veksthemmende effekt på de Gram-positive bakteriene *S. aureus* og *S. epidermidis*, og er i så måte et spennende utgangspunkt for potensiell videreutvikling av et terapeutisk agens [14].

- **Antifilariasis aktivitet**

Loa loa er en parasitt som forårsaker filariasis. Denne sykdommen finnes endemisk i Vest-Afrikas skogområder og er i denne regionen regnet som den tredje viktigste årsaken til medisinsk konsultasjon – etter malaria og lungesykdommer. Omtrent 200 millioner

mennesker lever i risikoområder for filariasissmitte, og mer enn 13 millioner mennesker er infisert av parasitten.

Studier av metanol barkekstrakt fra *Z. heitzii* er utført for å undersøke in vitro aktivitet på isolerte humane *Loa loa*-parasitter og cytotoksisitet på eukaryote celler. Resultater fra bioassay-forsøkene har ledet til spekulasjoner om det er alkaloidene i *Z. heitzii* som er ansvarlig for antifilariasis-aktivitet [9].

- **Insekticid aktivitet**

I Republikken Kongo er to slags snutebiller, *Sitophilus zeamays* og *Callosobruchus maculatus*, ofte en trussel og årsak til ødelagte mais- og bønnelagre. Disse billene blir derfor gjerne kilde til negative økonomiske ringvirkninger. Entomologiske studier har vist at heksanekstrakter fra barken til *Z. heitzii* er toksiske mot de ovennevnte snutebillene.

Den amerikanske kakerlakken *Periplaneta americana*, vanlig i tropiske områder, kan være en stor plage for mennesker og miljøet de lever i. Denne kakerlakken kan fremkalle allergiske reaksjoner, medføre forringelse av mat, ødeleggelse av papir og elektriske ledningssystemer, samt være opphav til forstyrrende støy i boliger. Videre kan disse også bringe med seg andre patogene organismer som kan smitte både mennesker og dyr.

Entomologiske studier har vist at heksanekstrakter fra barken til *Z. heitzii* er toksiske mot de tre ovennevnte insektartene. Dette har vært foreslått som en årsak til at dette treet aldri angripes av termitter i naturen [5].

- **Anti-sigdcelleanemi aktivitet**

Sigdcelleanemi er en recessivt genetisk arvelig blodsykdom karakterisert ved at erytrocyttene er abnormale både funksjonelt og fysisk. Normale erytrocytter (med hemoglobin A) er skiveformede, men ved sigdcelleanemi blir erytrocyttene sigdformede (med hemoglobin S). Formendringen hos erytrocyttene reduserer deres evne til å utøve sine normale funksjoner. O₂-transporten kan reduseres faretruende da disse erytrocyttene lettere ødelegges ved passasje gjennom trange kapillærer. I tillegg kan de også sette seg fast og dermed blokkere blodstrømmingen lokalt, noe som videre kan medføre at omkringliggende vev dør. Sigdcelleanemi er knyttet til økt dødelighet, men øker mulighetene for overlevelse ved malariasykdom. En teori er at blodcellens sigdform vanskeliggjør parasittens penetrasjon av

cellemembranen. Denne mutasjonssykdommen er mest utbredt i Afrika, og i enkelte områder er nær 40 % av befolkningen bærere av genet ansvarlig for sigdcelleanemi [15-17].

I en *in vitro*-studie ble sigdceller behandlet med fruktekstrakt fra *Z. heitzii*. Fruktekstraktet viste aktivitet mot sigdcelleanemi. I dag diskuteres det om den gunstige effekten skyldes fenoler, alkaloider eller saponiner i fruktekstraktet til *Z. heitzii* [8].

- **Anti-oksidant aktivitet**

Det er tidligere blitt demonstrert signifikant anti-oksidant aktivitet i fruktekstraktet fra *Z. heitzii*. Metodene benyttet knyttet til denne studie var FRAP (Ferric reducing activity of plasma) og DPPH (difenyldipikrylhydrazyl-scavenging) [8].

- **Immunmodulerende aktivitet**

Et vannekstrakt fra barken av *Z. heitzii*, fagaricine, har vist immunmodulerende effekter i behandling mot immunsvikt [18].

1.2 Malaria

1.2.1 Om sykdommen

Malaria er en potensielt livstruende infeksjonssykdom og skyldes en parasitt som spres gjennom myggstikk. Parasitten er en protozo tilhørende slekten *Plasmodium*, og overføres til menneskets blodkretsløp gjennom stikk fra infiserte *Anopheles* -hunnmygg[15]. Myggen fungerer som vektor for parasitten. Mennesket er parasittens eneste reservoar, og spredningen av sykdommen opprettholdes ved at parasitten overføres frem og tilbake mellom infiserte mennesker og mygg. Malariasmitte skjer med andre ord ikke direkte mellom mennesker. Parasitten kan imidlertid overføres ved bruk av skitne sprøyter eller gjennom blodtransfusjoner. Overføring av parasitten mellom mor og foster under svangerskapet er svært sjeldent[19]. Tidligere trodde man at sykdommen oppsto i myrlendte områder, derav navnet malaria da ”mal aria” betyr dårlig luft på italiensk [20, 21].

1.2.2 Etiologi

Det finnes i dag fem ulike parasitter som gir opphav til malaria. Disse sykdomsfremkallende endoparasittene deles også ofte inn i to former: benign og malign form. De benigne malariaparasittene er *Plasmodium vivax*, og de to mer sjeldne parasittartene *Plasmodium malariae* og *Plasmodium ovale* [15]. Disse parasittene kan gi alvorlige og kraftige symptomer, men er sjelden livstruende [22]. De maligne parasittene heter *Plasmodium falciparum* og *Plasmodium knowlesi*, og er ansvarlige for de alvorligste malariatilfellene. Parasitten *P. falciparum* er den mest dominerende arten og er også årsak til flest dødsfall. Det er først i de senere årene at *P. knowlesi* har blitt anerkjent som en malariafremkallende parasitt. Tidligere har denne parasittarten kun vært kjent for å angripe aper som finnes i enkelte skogområder i Sørøst-Asia [23].

1.2.3 Epidemiologi

Malaria er en av verdens mest utbredte infeksjonssykdommer [23] og forekommer endemisk i over 100 land i subtropiske og tropiske områder [15]. Det er estimert at omtrent halvparten av verdens befolkning (3,55 milliarder) lever i risikoutsatte områder for malariasmitte [24].

Verdens Helseorganisasjon (WHO) har i sin malariarapport fra 2013 estimert at det globalt i 2012 fant sted omtrent 200 millioner tilfeller av malaria der om lag 630 000 ledet til dødsfall. Av de estimerte dødsfallene forekom 90 % i Afrika sør for Sahara, og i de fleste av tilfellene (77 %) gjaldt dette barn under 5 år. Hvert eneste minutt dør et barn i Afrika grunnet malaria. De to landene, Den demokratiske republikken Kongo og Nigeria, står alene for 40 % av alle dødsfall knyttet til sykdommen i global sammenheng. Malaria forekommer også i Asia, Sør-Amerika og enkelte deler av Europa, dog i mindre grad [25, 26].

I Norge rapporteres omtrentlig 30 tilfeller av malaria til MSIS (Meldesystemet for infeksjonssykdommer) hvert år [22]. De fleste tilfeller er ervervet under opphold i Afrika, særlig i Vest-Afrika, men det finnes meget få registrerte dødsfall i Norge forårsaket av sykdommen. Det er oftest personer med utenlandsk opprinnelse som i Norge får diagnosen malaria. Dette er gjerne i forbindelse med besøksreiser til familie og venner i deres tidligere hjemland, som oftest i Afrika [19].

1.2.4 Risikogrupper

Ifølge Verdens helseorganisasjon (WHO) står noen spesifikke populasjonsgrupper i risikozonen for å utvikle malaria med fatale følger.

I risikosonen står blant annet barn som lever i risikoområdene og som ikke har utviklet immunitet mot de alvorligste sykdommene. Human immunitet har imidlertid vist seg å kunne forekomme hos voksne personer som lever i moderate til alvorlige risikoområder. Personer som eksponeres for malariasmitte gjennom flere år, kan utvikle partiell immunitet, men denne vil forsvinne dersom individet befinner seg utenfor risikoområdet i mer enn 6 måneder. Selv om fullstendig immunitet aldri kan oppnås, senker denne immuniteten risikoen for at en malariainfeksjon vil medføre alvorlig sykdom. Utvikling av partiell immunitet hos voksne individer er for øvrig årsaken til at de fleste dødsfall i Afrika forekommer blant små barn. I mindre smitteutsatte områder og der personene har lav immunitet mot malaria er alle aldersgrupper utsatt.

Gravide, også de som har utviklet partiell immunitet, utgjør alene en risikogruppe. Studier har vist at gravide blir stukket oftere enn andre og de utvikler også lettere alvorlig malariasykdom. Infeksjon forårsaket av *P.falciparum* - parasitten kan medføre maternelle dødsfall, lav fødselsvekt, spontanabort og prematur fødsel [27]. Ifølge norske retningslinjer frarådes derfor gravide å reise til områder med mulig malariasmitte.

På generell basis utgjør internasjonalt reisende fra ikke-endemiske områder en risikogruppe. Det finnes også undergrupper av reisende som er særlig utsatt for å utvikle alvorlig malariainfeksjon ved en eventuell smitte. Som nevnt over gjelder dette gravide, små barn, men også immunsupprimerte personer (eksempelvis HIV/AIDs-pasienter og legemiddelbrukere av sterkt immunsupprimerende preparater (deriblant glukokortikoider og TNF- α -blokkere)), reisende som oppholder seg langt unna helsevesen og såkalte ”ryggsekkurister” som er reisende uten fastlagt rute.

Som nevnt tidligere er immigranter og deres barn på besøksreiser til sine tidligere hjemsteder i malariautsatte områder en gruppe man bør være oppmerksomme på. Dette er grunnet deres avtagende eller fraværende immunitet, men også basert på tidligere erfaring med at denne gruppen ofte blir rammet [19, 22].

1.2.5 Symptomer

Symptomer på malaria er hovedsakelig feber og kjennetegnes som vekselvis frostanfall og svettetokter, henholdsvis betegnet som hyperpyreksi og hypotermi. Ofte ledsages disse anfallene av generelt nedsatt allmenntilstand der symptomene lett kan forveksles med

influenza. Andre symptomer som smerter i rygg, ledd, muskler, hodepine, kvalme, oppkast, samt diaré, er heller ikke uvanlig ved malariainfeksjon. Det bør mistenkes at personen har fått malaria dersom feber inntreffer under 3 måneder etter hjemkomst fra malariaområde. De første symptomene kan være både milde og vanskelige å knytte til malariasykdom. Hos individer med partiell immunitet kan asymptomatiske infeksjoner forekomme. Innledningsvis opptrer symptomene relativt likt uansett parasittart. Dersom man ved *P. falciparum* -malaria ikke behandles i løpet av de første 24 timene fra symptomene inntreffer, kan det utvikle seg raskt til livstruende symptomer og øke risikoen for død. De livstruende symptomene kan komme til uttrykk som blant annet cerebrale affeksjoner, på folkemunne kalt hjernemalaria, men også svikt i respirasjonsorganer i form av lungeødem, samt nyresvikt og sirkulatorisk sjokk. Malaria er i den henseende en sykdom der behandlingen må initieres så raskt som mulig.

Årsakene til symptomer på malaria forklares blant annet med at erytrocyttene sprekker. Feberen knyttes til lysis av erytrocyttene og immunsystemets forsøk på å fjerne cellemateriale, toksiner og merozoitter. Tapet av erytrocytter fører til anemi, svakhet og kraftløshet og den økte mengden hemoglobin i blodbanen vil kunne føre til gulsott. Ved infeksjon med *P. falciparum* kan det forekomme en form for malaria kalt "blackwater". Denne infeksjonen kjennetegnes ved nyresvikt med påfølgende mørk urin, misfarget av store mengder hemoglobin. I tillegg kan denne infeksjonen medføre tilfeller kalt hjernemalaria. Parasitten medfører endringer av overflateproteiner på infiserte erytrocytter, noe som bidrar til at de blir rigide og lite elastiske. Erytrocyttens evne til å passere kapillærer vil dermed reduseres og øke sannsynligheten for blokkade og videre stans i blodgjennomstrømningen. I verste fall kan dette utløse fatale cerebrale blødninger.

Tiden det tar fra man blir stukket av *Anopheles*-hunnmyggen og til man opplever symptomer på malaria varierer. Dette avhenger blant annet av type parasitt og eventuelle inntak av forebyggende legemidler. Hos ikke-immune individer inntreffer symptomene gjerne etter en uke, ofte 10-15 dager, etter malariaeksponisjon. Ved *P. falciparum* -malaria debuterer vanligvis symptomer de første 2-4 ukene og sjeldent mer enn tre måneder etter smitte. Det kan ta lengre tid før symptomer vises, dersom pasienten har gått på forebyggende medikamenter [15, 20, 22].

1.2.6 Patogenese

Plasmodium-parasittens livssyklus inndeles i en kjønnnet syklus og en ukjønnnet syklus. Parasittens seksuelle syklus finner sted i hunnlige *Anopheles*-mygg, mens den ukjønnede syklusen foregår i menneskekroppen. Den kjønnede syklusen i *Anopheles*-hunnmyggen innebærer at parasitten vil utvikle seg gjennom ulike stadier der dannelsen av sporozoitte finner sted. I mennesket vil parasitten utvikle og formere seg videre gjennom nye stadier og kunne danne merozoitter, trofozoitter, hypnozoitter og gametocytter.

Parasittens livssyklus kan inndeles i tre stadier:

Exoerytrocyttisk stadium

Det første stadiet foregår utenfor erytrocyttene slik som det også fremgår av navnet. Her overføres sporozoitte til menneskets blodkretsløp når myggen penetrer hudbarrieren, injiserer antikoagulantia og inntar blod fra et menneske. Sporozoittene vil deretter vandre med blodstrømmen til leveren og invadere de parenkymale levercellene. I løpet av 30 minutter vil sporozoittene være forsvunnet fra blodkretsløpet. I de neste 1-2 ukene vil de modnes i lever og utvikles til schizonte gjennom en ukjønnnet reproduksjon, kalt schizogoni. Deretter vil det økende antallet merozoitter medføre at den infiserte levercellen sprekker. Ferske merozoitter vil frigjøres og entre blodsirkulasjonen.

Parasittene *P. vivax* og *P. ovale* kan imidlertid også omdannes til hypnozoitter og gå i dvale over lengre tid i levercellene. Dette stadiet er asymptomatisk. Denne hvilende parasittformen kan slå seg til ro i uker eller år, men kan på et senere tidspunkt reaktiveres og gi tilbakefallende malariasykdom.

Erytrocyttisk stadium

Ved dette stadiet vil de frigjorte merozoittene fra levercellene penetrere erytrocyttene og invadere disse. Malariaparasitten formeres meget raskt i menneskekroppen, eksempelvis vil én enkelt *P. vivax*-parasitt kunne føre til dannelsen av 250 millioner merozoitter etter omtrent 14 dager. Merozoittene vil i erytrocyttene bli til en type intracellulære parasitter, kalt trofozoitter. Her vil det også skje en utvikling av schizonte slik som i levercellene. Til slutt vil erytrocytten lysere på grunn av dannelsen av nye merozoitter. Disse vil igjen kunne angripe nye blodceller og medføre lysis av flere slike celler. Det er ved dette stadiet at symptomene på malaria først fremtrer som feber. De periodiske episodene med feber - karakteristisk for malaria - skyldes et synkronisert utslipp av merozoitter og lysis av

erythrocytter. Denne synkronisering skjer syklisk hver 48.-72. time, avhengig av type *Plasmodium*-parasitt og denne syklusen vil foregå repetitivt. Etter hvert vil mennesket lide av anemi grunnet parasittenes angrep på de røde blodlegemene som sakte men sikkert reduseres i antall.

Enkelte merozoitter derimot, vil forbli inne i erythrocytten og vil kunne utvikle seg til mannlige og kvinnelige gametocytter.

Sporogent stadium

Her vil parasitten eksistere som gametocytter og de kan først fullføre sin livssyklus ved å bli tatt opp av myggen når den suger blod fra et infisert menneske. I myggens mage-tarmsystem vil gametocytten kunne bli omdannet til gameter. Hanngametene fertiliserer hunngametene gjennom kjønnnet formering, for på den måten å produsere zygoter. Videre differensiering vil danne oocyster, og disse vil gjennomgå meiose og sporozoitter dannes. Disse sporozoittene vil migrere til myggens spyttkjertler - klare til å overføre malariasykdommen over til et nytt menneske ved neste myggstikk [15, 20].

1.2.7 Dagens behandlingsalternativer

Malaria er en potensielt dødelig sykdom, som man langt på vei kan forhindre ved profylaktiske tiltak. Den enkleste måten å unngå alvorlig malariasykdom er følgelig å gjøre valg som hindrer muligheten for smitte. Dette gjelder alle som bor i malariautsatte områder, men spesielt for tilreisende som har tilnærmet ikke-eksisterende immunitet.

Profylakse:

Profylakse mot malaria kan deles inn i to undergrupper; eksposisjonsprofylakse og kjemoprofylakse.

Ved eksposisjonsprofylakse er intensjonen å forhindre at man blir utsatt for et myggstikk, noe som er vurdert som den beste og sikreste profylaksemetoden. På grunn av malariamyggens aktivitet er det ved og etter solnedgang viktig å begrense aktiviteter utendørs, bruke repellerende insektmidler og beskytte naken hud med plagg. Dette gjøres ved å benytte langermede plagg på torso, langbukser og plagg som beskytter nakne føtter og ankler. Ved overnatting er bruk av insekticidimpregnerte myggnett viktig, selv når man sover innendørs.

Impregnerte myggnett i vinduer, dører og ventiler er med på å øke sannsynligheten for at hjemmet er myggfritt[23].

Kjemoprofylakse kommer sekundært i forhold til myggstikkprofylakse og skal alltid kun være et tillegg til dette. Kjemoprofylakse er ikke 100 % effektiv og bærer ofte med seg enkelte bivirkninger som kan kjennes ubehagelige. Det må spesielt også vurderes i hvilket område man skal oppholde seg og risiko for *Falciparum*-malaria på stedet. Profylaksen består hovedsaklig av legemidler som også brukes til behandling av manifest sykdom og blir kort oppsummert her [22]. Personer som skal oppholde seg i områder med klorokin-resistente *falciparum*-stammer, bør forskrives enten atovakvon-proguanil, doksysykin eller meflokin. De to førstnevnte regimene tas daglig, mens meflokin kan tas en gang i uken. I enkelte områder i sørøst-Asia er meflokin-resistente stammer blitt observert. Her kan fortsatt tovakon-proguanil og doksysykin benyttes [28].

Behandling av sykdom

Foretrukket behandling av manifest malaria, varierer i forhold til hvilken type parasitt som har forårsaket sykdommen. Benign malaria som er forårsaket av *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* og *Plasmodium ovale*, er relativt ukomplisert og behandles med klorokin/hydroksyklorokin (med et tillegg av primakin ved smitte av *P. vivax* eller *P. ovale*).

Potensielt malign malaria forårsaket *Plasmodium falciparum* skal behandles ulikt utifra om sykdommen har et ukomplisert eller komplisert forløp. Pasienten burde uansett alltid overvåkes på sykehus, da denne formen kan forverres raskt. Ved ukompliserte tilfeller er nyere artemisinkombinasjoner, ACT (artemisinin-based combination therapy), blitt førstevalg. Disse virker raskt og har god bivirkningsprofil, men er dessverre utilgjengelig mange steder. Atovakvon-proguanil og meflokin brukes også regelmessig, der førstnevnte ofte foretrekkes på grunn av bivirkningsproblematikk.

Ved kompliserte tilfeller er parenteralt administrert artesunat førstevalg, med intravenøs kinin som et fullgodt alternativ. Når pasienten er klinisk stabil, kapabel til å svelge selv og parasitemigraden er under 1 %, anbefales overgang til oral ACT-terapi som beskrevet over[22].

1.2.8 Dagens malariasituasjon

Økt bruk av insektmidler og myggnett innendørs, har de senere årene ført til at den globale malariasituasjonen er blitt kraftig forbedret. Likevel er resistensutvikling hos de sykdomsfremkallende plasmodiene et økende problem, og noe som potensielt sett kan bli en alvorlig utfordring i fremtiden. Dette kan illustreres særlig godt ved eldre behandlingsalternativer som klorokin og sulfadoxin/pyrimetamin, som nesten ikke har effekt på *P. falciparum* lenger. Effektiviteten av nyere og anbefalte behandlingsregimer er fortsatt høy (> 95 %), utenom enkelte deler av sørøst-Asia hvor det er blitt observert resistensutvikling mot meflokin. I likhet med andre antibakterielle agenser i medisinsk bruk, er det historisk sett svært sannsynlig at ytterligere resistens vil oppstå ved overdreven eller ukritisk bruk. Dette understreker ikke bare behovet for nye og innovative legemidler i fremtiden, men også flere profylaktiske hjelpemidler som effektive insektrepellenter til daglig bruk [22].

1.3 Mygg

1.3.1 Tovinger (Diptera)

Myggen (Nematocera) tilhører ordenen tovinger (Diptera) da de, som navnet tilsier, har ett par med vinger. Under denne ordenen finnes flere ulike og velkjente myggfamilier slike som stikkemygg (Culicidae), knott (Simuliidae) og stankelbein (Tipulidae). De er utbredt over hele jordkloden, unntatt områder med kontinuerlig permafrost. Tre fjerdedeler av alle myggarter lever i fuktige trope- og subtropiske områder da kombinasjonen av varmt og fuktig klima er ypperlig for både rask utvikling og overlevelse [29]. I tropiske områder kan levetiden til en ferdigutviklet voksen mygg variere fra noen dager til flere uker. I tempererte regioner er myggens levetid vanligvis lengre, og voksne hunnmyggarter som kan overvintre, kan leve opptil ett år. I Norge er det registrert 28 myggfamilier og 1825 myggarter [29, 30]. På verdensbasis er det registrert omtrent 3500 myggarter der 400 tilhører arten *Anopheles* [29, 31]. Malariamyggen, *Anopheles*, hører med til myggfamilien stikkemygg (Culicidae) [29].

1.3.2 Stikkemygg (Culicidae)

Stikkemygg kjennetegnes blant annet ved deres lange bein og smale, lange vinger med skjell langs årene. I tillegg er vingene gjerne lengre enn bakkroppen som ellers er dekket av iøynefallende tegninger. Hannen lever utelukkende av planter og suger plantesaft, nektar eller

honningdugg [30, 32]. Hunnmyggen er i tillegg blodsugende og suger også blod fra varmblodige virveldyr [32]. Kjønnene hos myggen kan avgjøres visuelt; antennene er fjærliknende hos hannen, mens hunnens er nedtonet og i sammenligning tilnærmet hårløs. Munnpartiet danner en lang og tynn stikkesnabel der over- og underkjeve, samt underleppe er forlenget. Overflaten av eksempelvis blad eller hud, penetreres ved hjelp av overkjeven, mens underkjeven er ansvarlig for oppsugning og transport av flytende næringsmedium, for eksempel plantesaft eller blod [30, 33, 34].

Mange stikkemyggarter, *Aedes*, *Culex* og *Anopheles*, kan være smittebærere av farlige sykdomsorganismer som de kan overføre gjennom bitt. De nevnte artene er involvert ved smitteoverføring av blant annet gulfeber, denguefeber, filariasis og malaria. Sykdommen malaria er knyttet til *Anopheles* [30, 34, 35].



Figur b. Fra venstre: Hannkjønn og hunnkjønn *Anopheles gambiae*.

Tabell 2. Sykdommer som overføres av moskitoer og andre bitende Diptera (Kilde: WHO: Mosquitos and other biting Diptera[36].

Vektor	Sykdommer
<i>Moskitoer (Culicidae)</i>	
<i>Anopheles</i>	Malaria, lymfatisk filariasis
<i>Culex</i>	Lymfatisk filariasis, japansk encefalitt, andre virussykdommer
<i>Mansonia</i>	Lymfatisk filariasis
<i>Andre bitende Diptera</i>	
Tsetsefluer (<i>Glossina</i>)	Afrikansk sovesyke
Svartfluer (<i>Simulium</i>)	Onchocerciasis (elveblindhet), mansonellosis (vanligvis symptomfri)
Sandfluer(<i>Phlebotomus, Lutzomyia</i>)	Leishmaniasis, sandfluefeber
Klegg (<i>Tabanidae</i>)	Loiasis, tularemi
Sviknott (<i>Ceratopogonidae</i>)	Mansonellosis (vanligvis symptomfri)

1.3.3 *Anopheles* -mygg

Omtrent 30-40 *Anopheles*-arter er assosiert med overføring av malaria. *Anopheles* kan gjenkjennes ved deres karakteristiske stikkeposisjon og spesielle hvilestilling [34]. Tuppen av magepartiet peker oppover, i motsetning til andre myggarter der abdomen ligger parallelt med underlaget. Det som også skiller den fra andre myggarter, er deres sterke preferanse for mennesker, da de fleste myggarter hovedsakelig har andre virveldyr som målorganisme. Overføring av malariasykdom kan også forekomme via andre myggslekter enn *Anopheles*, men dette skjer bare unntaksvis. Malariamyggen, *Anopheles maculipennis*, finnes også i Norge, men har i dag ingen betydning som sykdomsoverfører. Malaria var vanlig i Norge frem til 1800 [32].

Artene *Anopheles gambiae* og *Anopheles arabiensis* er særlig knyttet til den høye insidensen av malaria, grunnet relativ lang levetid og preferanse for mennesker[29]. *Anopheles*-myggen regnes ofte som et av verdens farligste dyr grunnet deres tilknytning til malaria. For at myggen effektivt skal kunne overføre sykdommen mellom mennesker finnes en del faktorer som må være tilstede:

Kvantum - Det må eksistere et tilstrekkelig høyt antall mygg til å sikre at myggen vil komme i kontakt med malariasmittede mennesker.

Levetid – Myggen må kunne leve lenge nok etter blodspising slik at parasitten kan få muligheten til å utvikle og bevege seg til myggens spyttkjertler.

Menneskekontakt – Myggen må foretrekke å konsumere blod fra mennesker fremfor dyr. I tillegg må de kunne overleve, legge egg i områder som ligger i nærheten av mennesker og gjerne komme seg inn i husene deres.

Kapasitet – myggen må kunne bære nok malariaparasitter i spyttkjertlene for å sikre at parasitten overføres til neste individ [31].

Nyere observasjoner har vist at malariamyggen er meget tilpasningsdyktig og responderer på endringer i miljøet. Vanligvis er myggen aktiv mellom solned- og soloppgang, mens observasjoner tyder på at denne myggarten nå starter med å suge blod tidligere på dagen. Dette er antakelig en respons på den stadig økte bruken av impregnerte nett med insekticider innendørs på kveldstid [37].

1.3.4 Myggens livssyklus

Insektordenen tovinger (Diptera) gjennomgår en fullstendig forvandling, kalt holometabol utvikling. Det betyr at når egget klekkes, gjennomgår larven flere stadier og hudskifter før den danner en puppe som den voksne myggen til slutt kommer ut av [30]. Utviklingen tar vanligvis mindre enn tre uker [34], og prosessen kan skisseres slik: egg → larvestadium 1 (L1) → larvestadium 2 (L2) → puppe → voksen mygg, der pil symboliserer hudskifte [30]. Mygglarven går gjennom fire stadier der det fjerde hudskiftet er utvikling av puppe [29]. Holometabol utvikling eksisterer også blant andre insektordener slike som biller, sommerfugler og veps [30]. Nedenfor beskrives de ulike utviklingsstadiene til myggen fra eggene legges til de ferdigutvikles som mygg:

Egg

Hunnmyggen legger 50 til 500 egg av gangen på vannoverflaten, fortrinnsvis i stillestående vann [29, 33]. Eggene som legges blir liggende å flyte på vannets overflate, enten enkeltvis som for *Anopheles*, eller i flytende flåteformede klumper som for *Culex* [29]. De fleste stikkemyggarter legger egg på ettersommeren/høsten, og disse vil overvintre som egg [32]. Ved høyere temperaturer når det er varmt og fuktig, kan *Anopheles* legge egg hver andre eller tredje dag [29].

Larver

Mygglarvene kan leve i omtrent all slags stillestående vann, fra dyrs fotavtrykk til innsjøer. De fleste myggarter lever i ferskvann, men enkelte arter kan tilpasse seg et liv i brakkvann og innsjøer med høyt saltinnhold. Det er to avgjørende faktorer knyttet til deres utvikling og overlevelse: tilgang til oksygen og føde i form av vannbårne partikler. Som et resultat av mygglarvenes behov for oksygen, befinner de seg mer eller mindre permanent ved vannets overflate. Det finnes også arter som i stedet hyppig stiger opp til vannskorpa for å puste [29, 33, 34].

Mygglarvenes respirasjon foregår gjennom trakéåpninger på bakkroppen. Når larvene ikke respirerer, spreller de gjerne rykkvis rundt i vannet. Mygglarvens næringsbiologi er forskjellig fra de voksne da de er overveiende detritusetere (spiser dødt organisk materiale), men noen er bytteetere og kan spise hverandre [33]. Mygglarvene spiser også akvatiske mikroorganismer som bakterier og alger [29]. Larven har ikke synlige vingeanlegg; vingene utvikles innvendig, og larven er oftest helt ulik det ferdigvokste insektet [30].

Puppe

Mellom larvestadiet og det voksne stadiet er det innskutt et puppestadium [30]. Puppen er en akvatisk organisme og ser ut som et komma. Den vil kunne ferdigutvikles i løpet av en til to dager dersom temperaturen er høy nok [29]. Puppene er oftest inaktive og tar ikke til seg næring. Det er først på dette stadiet at vingeanleggene blir synlige [30]. Når den voksne myggen er ferdig dannet inni puppen, vil hylsteret briste og myggen vil sakte krype ut på vannoverflaten [29].

Ferdigutviklet voksen mygg

Både hunn- og hannmygg spiser plantesaft som er en viktig kilde til energi. Hunnmyggen er i tillegg avhengig av blodkonsum, da blodproteiner antas å være viktig for produksjon og modning av egg. Myggen finner sitt blodreservoar gjennom en rekke ”signaler” som sendes ut fra verten. Kroppslukt og karbondioksid utskilt fra verten føres med vinden og stimulerer sansereseptorer på hunnmyggens antenner og palper. Når myggen nærmer seg verten, bidrar visuell stimuli og varmestrømmer til lokalisering av egnet sted å suge blod. Straks myggen lander på det aktuelle stedet, penetrerer munnpartiet gjennom huden. Dens spytt inneholder komponenter som hemmer vertens hemostase, noe som hindrer blodkoagulering og sikrer en kontinuerlig tilførsel av næring. Innen få minutter kan myggen suge en mengde blod som tilsvarer opptil fire ganger deres egen vekt.

Myggens atferdsmønster varierer mellom de ulike artene. *A. gambiae* er mest aktiv som blodsuger de fire første timene etter midnatt. Aktiviteten styres av en indre biologisk klokke, sirkadisk rytme, som justeres ved solnedgang, men er ikke direkte påvirket av lys eller mørke [29].

1.4 Rekelarver (Brine shrimps)

Rekelarver fra slekten *Artemia* er en vanlig brukt organisme i forbindelse med toksisitetmålinger [38]. I tillegg er disse leddyrene viktige som mat for fisker og som akvariefôr (Hågvar). I denne oppgaven var det arten *Artemia salina* som ble benyttet ved de innledende toksisitetsstudiene på *Z. heitzii*. Denne organismens naturlige habitat er innsjøer, gjerne med høyt saltinnhold. De lever blant annet i verdens største innsjø, Det Kaspiske hav. De ble beskrevet i Iran allerede i år 982, og de første tegningene av organismen dateres til 1756 i arbeidet til D. Schlösser [39]. På engelsk blir de gjerne omtalt som "sea-monkeys" [38], og går under den taksonomiske ordenen Anostraca – på norsk "tusenbeinkreps" [30].

2 Materialer

2.1 Kjemikalier

Kjemikaler	Produsent
Aceton	Carlo Erba Reagents, Frankrike
Cerium(IV)sulfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Diklormetan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Etanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
n-heksan	Fisher, Loughborough, England
Metanol	Chemi-Teknik AS, Oslo Norge
N ₂ -gass	AGA, Oslo, Norge
Silikagel til kromatotron: Silica gel PF254 containing gypsum (nr. 7749)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tetrametylsilan (TMS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland

2.2 Apparat

Apparat	Produsent
<i>Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC)</i>	
Tynnsjikt-kromatografi: Merck Si gel 60F254 0,2 mm på aluminiumfolie (nr. 5554) eller Merck Si gel 60F254 0,25 mm på glassplater (nr. 5715)	Merck, Darmstadt, Tyskland
End-to-end pipetter, 10 µl	Modulohm, Herlev, Danmark
Elueringskar, glass	Merck, Darmstadt, Tyskland
UV-kammer, UVSL-58	Ultra-Violet Products, Santa Barbara, USA
<i>Pipetter</i>	
Automatpipetter	Thermo Fisher, Oslo, Norge
<i>Filter</i>	
Filterpapir: Whatman nr. 1	Whatman, Maidstone, England
<i>HPLC</i>	
Analytisk HPLC kolonne Varian Microsorb 100-5 C18, 250 x 4,6	Varian, Palo Alto, USA
Preparativ HPLC kolonne Varian Microsorb 60-8 C18, 250 x 21,4 mm	Varian, Palo Alto, USA
<i>Kolonnekromatografi</i>	
Buchi 681 kromatografi pumpe	Buchi, Flawil Sveits

VersaFlash kolonneholder	Supelco, Bellefonte, PA, USA
VersaFlash silikakolonne:	
Versapak 40x150 mm sfærisk silikagel (97782-U),	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak 110x300 mm silikagel (97712-U),	Supelco, Bellefonte, PA, USA
Versapak 40x150 mm silikagel (97706-U),	Supelco, Bellefonte, PA, USA
<i>Sentrifugalt akselerert kromatografi</i>	
Kromatotron: Modell 7924T	Harrison Research, Palo Alto, CA, USA
Kromatotronplater, 1-2 mm tykk silikagel tynnsjiktplate: Silika Gel PF.254 gipsholdig, Merck 7749.	Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Spektrometer</i>	
NMR-spektrometer: DPX300 (300 MHz for proton, 75 MHz for karbon) eller AVII400 (400 MHz for proton, 100 MHz for karbon)	Bruker, Rheinstetten, Tyskland
<i>Pumper</i>	
Edwards E-LAB 2	Edwards High Vacuum Int., Crawley, England
Pumpe til kolonnekromatografi: Büchi B-681,	Büchi, Flawil, Sveits
<i>Rotavapor</i>	
Rotavapor med varmebad, HB10/RV10	IKA, Staufen, Tyskland
Vakuumpumpe, Ilmvac 400171	Ilmvac, Ilmenau, Tyskland

<i>Vekter</i>	
Ikke analytisk: Mettler PM4800 DeltaRange,	Mettler Toledo, Greifensee, Sveits
Analytisk: Sartorius BP2218,	Sartorius, Göttingen, Tyskland
Til veiing av mygg: Sartorius CPA225D	Sartorius, Göttingen, Tyskland
<i>Skap med standardiserte betingelser</i>	
Klimaskap: Binder 1-KBF 720,	Binder, Tuttlingen Germany
Termostatert varmeskap: T6	Thermo Electron, Langenselbold, Tyskland
<i>Annet</i>	
Knivmølle	Brabender, Duisburg, Tyskland
Lampe til rekellarvetest	Luxo, Oslo, Norge
Vannrenseinstrument: Millipore Elix med Progard NP2 kolonne	Millipore, Billerica, MA, USA

3 Metoder

3.1 Generelle metoder

3.1.1 Innveiging

Veiging ble foretatt på Mettler overskålsvekt eller Sartorius analysevekt.

3.1.2 Vannkvalitet

Vannet som ble benyttet, var deionisert vann fra Millipore-reanseanlegg.

3.2 Separasjonsmetoder

3.2.1 Ekstraksjon med organiske løsemidler

Et heksanekstrakt av plantematerialet ble laget i en Soxhlet-ekstraktor.

3.2.2 Kolonnekromatografi med forhøyet trykk

VersaFlash kolonneseparasjon

VersaFlash er en variant av tradisjonell kolonnekromatografi, og metoden benyttes til å separere ulike kjemiske forbindelser som er tilstede i samme løsning, basert på stoffenes egenskaper. Disse separasjonskolonnene kommer ferdigpakket, og de bruksklare kolonnene kan skaffes med både polar og upolar stasjonærfase. De er dermed mye enklere i bruk enn tradisjonelle kromatografikolonner som må pakkes og klargjøres med stasjonærfase manuelt. Når kolonnen er klargjort og kondisjonert med egnet elueringsmiddel, påsettes prøveløsningen øverst på stasjonærfasen. For å oppnå tilstrekkelig hastighet av elueringsmiddelet under separasjonen er systemet satt under trykk ved hjelp av en pumpe. Forskjeller i struktur hos de ulike forbindelser sørger for at disse vil komme ut av kolonnen til ulik tid. Dette avhenger av hastigheten stoffene transporteres ved gjennom kolonnen, der stoffer som retarderes mye på kolonnen kommer senere ut enn stoffer med lite retardasjon. Til slutt samles eluatet opp i ulike fraksjoner for videre bearbeidelse. For å kunne følge og

vurdere separasjonen underveis, er det vanlig å følge elueringen med TLC. Da benyttes gjerne samme stasjonærfase og elueringsmiddel. Kolonnekromatografi er en velegnet og enkel metode til å separere stoffer og brukes i stor skala over hele verden.

Normalfase

Normalfasekromatografi er metode der stasjonærfasen består av partikler med polar overflate og hvor mobilfasen er ett eller flere organiske løsemidler i blanding. De polare overflateegenskapene til stasjonærfasen vil interagere med og retardere stoffer med polare strukturelementer, og det er disse interaksjonene som styrer separasjonen. For å styre separasjonen kan man endre på type stasjonærfase og/eller endre på sammensetningen av mobilfase. Større andel polar tilsetning i mobilfasen vil føre til redusert retardasjon av de ulike stoffene.

Silikagel er den viktigste stasjonærfasen i normalfasekromatografi. Dette materialet er porøst, og kun en liten mengde silikapulver vil gi en meget stor overflate. Den store kontaktflaten er dekket av silanolgrupper (Si-OH). De viktigste polare interaksjonene som oppstår under kromatograferingen er ioniske interaksjoner, hydrogenbindinger og dipolbindinger. Aminer og andre basiske grupper vil retarderes i stor grad på silika, da silanolgruppene er svakt sure og det vil dannes flere sterke, ioniske bindinger mellom basiske stoff og silika [40].

Omvendtfase

I motsetning til normalfase er stasjonærfasen i omvendtfase-kromatografi av hydrofob karakter. Prinsippet for separasjonen er det samme som ved normalfasekromatografi, men avgjøres på mange måter ved "motsatte" egenskaper. Separasjonen styres her av de hydrofobe reaksjonene som oppstår i kolonnen og mobilfasen som benyttes er vandige løsninger, ofte med organisk modifikator som er blandbar med vann (for eksempel metanol eller acetonitril). Stasjonærfasen er som regel silika hvor det er blitt påsatt hydrofobe deler, ofte lange hydrokarbonkjeder, på silanolgruppene. Vanlige benyttede hydrokarbonkjeder er octadecyl ($((\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3)$), mer kjent som C18, og octyl ($((\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3)$), mer kjent som C8. Separasjonen er i all hovedsak avhengig av de hydrofobe interaksjonene *van der Waals-krefter*. Dette er forholdsvis svake interaksjoner, men de blir sterkere med økt molekylvekt av hydrofobe molekyldele. De mest hydrofobe stoffene får sterkest retardasjon i kolonnen. Ioniserbare stoffer vil få kortere retensjonstid ved økende ionisering [41].

3.2.3 Høytrykksvæskechromatografi (HPLC)

Prinsipp

HPLC (høytrykksvæskechromatografi, eng. High Performance Liquid Chromatography) er en automatisk og kombinert metode som brukes til å separere og detektere ulike stoffer i løsning. Prinsippet bak en separasjon av komponenter i prøveløsning, er den samme som for annen kolonnechromatografi som er beskrevet tidligere, se foregående avsnitt. Kort beskrevet retarderes stoffene i prøveløsningen ulikt avhengig av deres affinitet til stasjonærfasen i HPLC-kolonnen. Selve metoden setter imidlertid høyere krav til pumpe og utstyr som benyttes. Pumpen må kunne opprettholde et definert trykk av mobilfase slik at væsken pumpes gjennom kolonnen med konstant hastighet mot et høyt trykk. Dette mottrykket på om lag 30-300 bar oppnås ved at kolonnens stasjonærfase består av små, tettpakkede, uniforme og runde partikler. Kolonnene som benyttes er vanligvis 10-25 cm lange stålrør, har en indre diameter omkring 4,6 millimeter der stasjonærfasen er ferdig pakket. Type stasjonærfase varierer avhengig av valgt væskechromatografisk metode, være seg normalfase-, omvendtfase-, eller eksklusjonschromatografi. Ulike kolonnematerialer som da kan benyttes er eksempelvis ofte silika ved normalfasechromatografi og C8- eller C18-bundet silika ved omvendtfasechromatografi.

Mobilfase med prøveløsning presses gjennom en kolonne med stasjonærfase, hvorpå stoffene retarderes og separeres avhengig av kjemisk struktur. Vanlig brukte partikkelstørrelser i kolonnen er 3-10 μm , der mindre partikkelstørrelse fører til redusert båndspredning og forbedret separasjon av prøveløsningen.

HPLC har egne injeksjonssystemer som skal sikre at prøveløsningen blir injisert med høyt trykk inn i væskestrømmen rett før kolonnen. Injeksjonssystemet kan lades med flere prøver og automatiseres, slik at HPLC-apparaturen kan arbeide hele døgnet. Dersom elueringstiden for de ulike stoffene varierer stort, er det mulig å utføre gradienteluering. Dette innebærer at mobilfasen elueres med gradvis økende løsemiddelstyrke i forhold til kolonnematerialet underveis i separasjonen. Eluering med en konstant mobilfase kalles isokratisk eluering.

I enden av kolonnen sitter detektoren, som er ansvarlig for å gi en elektronisk respons på de ulike stoffene som elueres. UV-detektoren er den mest brukte detektoren og kan brukes for å påvise stoffer med absorpsjon av UV-lys.. Det finnes en rekke andre detektorer, med ulik spesifisitet og følsomhetsnivå. Eksempelvis kan diodearraydetektoren benyttes til å identifisere stoffer i prøveløsningen ved at å ta opp et fullstendig UV-spektrum. Responsen er proporsjonal med massen av stoff i mobilfasen, og HPLC kan på det grunnlag benyttes til kvantitative analyser. HPLC-kolonnens gode evne til å separere stoffer kan anvendes også preparativt i en opprensningsprosess. Basert på respons fra detektoren underveis i separasjonen kan prøveløsningen samles opp i separate fraksjoner. Preparativ HPLC benyttes ofte for å oppnå helt rene og isolerte naturstoffer som siste ledd i en renseprosess [42].

Kjemikalier

Destillert vann

Acetonitril

Utstyr

HPLC-apparatur

Analytisk HPLC-kolonne

Preparativ HPLC-kolonne

Prøveglass

Vialer for HPLC-autosampler

Sprøyte (Microliter syringes)

Sprøytedrevet filter, 0,45 µm

Separasjonsmetoder

Prosedyre for preparativ HPLC

1. Kolonnen kondisjoneres med starteluent i 20 minutter

2. Prøve løses i ca 1 ml 100 % acetonitril
3. Prøveløsningen filtreres gjennom et sprøytetrevet filter for å ekskludere partikler som potensielt kan tilstoppe kolonnen
4. Prøveløsning injiseres via injeksjonsloopen
5. Gradienteluering benyttes da stoffene som separeres retarderes ulikt.
6. UV-VIS detektor benyttes og bølgelengder i området 200-500 nm.
7. Fraksjoner samles opp basert på detektorresponsen
8. Kolonnen og injeksjonsloopen vaskes med egnet løsemiddel for å skylle ut eventuelle rester

Identifikasjonsmetoder

Prosedyre for analytisk HPLC

1. Kolonnen kondisjoneres med starteluent lik egnet mobilfase i 20 minutter
2. Prøve løses i 100 % acetonitril.
3. Prøveløsningen filtreres gjennom et sprøytetrevet filter for å ekskludere partikler som potensielt kan tilstoppe kolonnen
4. Prøveløsning overføres til vial og settes i HPLC-autosampler.
5. Gradienteluering benyttes da stoffene som separeres retarderes ulikt.
6. Diodearraydetektor benyttes og bølgelengder i området 200-500 nm.
7. Kolonnen vaskes med egnet løsemiddel for å skylle ut eventuelle rester

3.2.4 Kromatotron (CA-TLC)

Prinsipp

Kromatotron er en apparatur for preparativ kromatografi som benyttes til å separere ulike stoffer i løsning. Denne metoden kalles også sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi (CA-TLC). Metoden baserer seg på sentrifugalprinsippet, som sammen med kapillærkrefter er beveggrunnen for prøveløsningens forflytning gjennom stasjonærfasen. Apparatet består i hovedtrekk av en rund plate med fordelt stasjonærfase (silika tilsatt gips som bindemiddel), som ved hjelp av en motor blir rotert rundt i konstant hastighet. Nitrogengass blir tilført og danner en nitrogenholdig atmosfære over kromatotronplaten for å hindre oksidasjon av stoffene i prøveløsningen. Prøven appliseres nær midten av den roterende platen og sentrifugalkreftene trekker prøveløsningen ut mot kanten. Forbindelsene i prøveløsningen retarderes i ulik grad av stasjonærfasen, og dette resulterer i sirkulære bånd av separerte stoffer. Når de separerte stoffene har vandret frem til kanten av platen, vil et oppsamlingssystem sørge for at de overføres til et rør sammen med løsemiddel. Herfra kan fraksjoner samles opp slik som ved bruk av tradisjonell kromatografi.

Ved bruk av UV-lys er det også mulig å observere separasjon av UV-absorberende eller fluorescerende stoffer i sanntid, ettersom de ulike stoffene ofte vil fremstå som blå-lilla bånd på den roterende platen, siden silikagelen som brukes er tilsatt et stoff som fluorescerer ved kortbølget UV-bestråling og lokket på kromatotronen er gjennomskinnelig for UV-stråling. Metoden er rask i bruk og utføres gjerne på 20-60 minutter. Muligheten til bruk av ulike tykkelser stasjonærfase (silikagel) kan gi stor kapasitet, og stasjonærfasen kan enkelt vaskes og klargjøres for ny kromatografering. Ved stor forskjell i retensjonsfaktor for de ulike stoffene er det en fordel at gradienteluering kan benyttes. Det er ingen behov for avanserte systemer eller forhøyet trykk som ved HPLC. Separasjonen kan også enkelt følges ved bruk av tradisjonell TLC. En begrensning ved denne metoden er at man er begrenset til normalfase silikagel som stasjonærfase [43].

Kjemikalier

Diklormetan

Etylacetat

Nitrogengass

Utstyr

Kromatotron

Kromatotronplater, 1-2 mm tykk silikagel

Dramsglass

Prosedyre

1. Prøveløsningen appliseres nær sentrum av den roterende platen. Deretter mates eluent inn samme vei, og påsatte stoffer migrerer til ytterkant av platen, slynges av og renner ned til bunnen av kromatotronen og ut gjennom en åpning.
2. Eluert prøveløsning samles i dramsglass. Analytisk tynnsjikt-kromatografi, sammenslåing og inndamping av fraksjoner og NMR-spektroskopi utføres.

3.3 Identifikasjonsmetoder

3.3.1 Analytisk tynnsjiktskromatografi (TLC)

Prinsipp

Tynnsjiktskromatografi, forkortet TLC, er en hyppig brukt separasjonsmetode innenfor analytisk og preparativ kjemi. Metoden krever svært lite apparatur, og de små kravene til forarbeid gjør metoden enkel å ta i bruk.

I tynnsjiktskromatografi kan det benyttes plater med ulike stasjonærfaser, både polare og upolare, men det vanligste er å benytte seg av plater med silika. Stasjonærfasen er ferdig spredt utover en tynn plate, og prøveløsningen appliseres direkte på stasjonærfasen. Prøveløsningen lages ved å løse opp analytten i et flyktig løsemiddel. Videre appliseres prøveløsningen på punkter ca. 2 centimeter fra platens nederste ende på en rett linje parallelt med kanten. Etter klargjøring av platen settes den ned i et lukket kar med mobilfaseblanding, hvor væsken holder et høydenivå lavere enn linjen der prøvene er blitt påsatt. Det lukkede karet sørger for å ivareta likevekten mellom flytende og fordampet mobilfase. Når TLC-platen settes i karet og kommer i kontakt med mobilfasen, trekker kapillærkrefter mobilfasen oppover platen sammen med komponenter fra påsatt stoff. Stoffenes migrasjon avhenger av fordeling mellom stasjonærfase og elueringsmiddel. Dersom stoffer danner interaksjoner med stasjonærfasen, vil de retarderes og migrere kortere. Videre vil stoffer som har lignende egenskaper som elueringsmiddelet avsettes lengre opp på platen. Økende løsemiddelstyrke sørger for at stoffene vil bevege seg lengre. Når elueringsmiddelet nærmer seg enden av platen, er TLC-platen ferdig utviklet. Da kan den tas ut av karet, og tilbakelagt avstand av mobilfasen merkes av umiddelbart. Etter at den flyktige mobilfasen er fordampet, kan platen analyseres. Et mål for stoffenes retensjon på TLC-platen, under spesifiserte betingelser, angis som retensjonsfaktor, R_f . Retensjonsfaktoren av de ulike stoffene bestemmes og kvantifiseres ut ifra hvor langt de har migrert i forhold til væskefronten, og defineres slik:

$$R_f = a/b$$

der a er avstanden fra stoffenes startlinje til flekkenes midtpunkt, og b er avstanden mellom startlinjen og væskefronten. Retensjonsfaktoren vil alltid ha en verdi mellom 0 og 1. For å

oppnå optimal separasjon på platen ønskes det en retensjonsfaktor i området 0,2-0,8 for de ulike stoffene.

Påvisning av separerte stoffer på TLC-platen skjer på ulike måter. De separerte stoffene påvises som flekker ofte ved hjelp av UV-stråling, gjerne i både langbølget- og kortbølget lys ved henholdsvis 254 nm og 366 nm. Her benyttes fluorescerende TLC-plater der UV-absorberende stoffer fremstår som mørke flekker mot lys grønn bakgrunn. Fargeløse stoffer fremkalles gjerne også med lokaliseringsreagenser, eksempelvis som Ceric, se side. 35. Slike reagenser synliggjør flekker med gitte kjemiske egenskaper. Bruk av jodkammer er òg en måte å fremkalle flekker på. Her vil TLC-platen legges i et kar med lokk inneholdende jodkrystaller, og jodkomplekser i form av brune flekker kommer til syne. De brune flekkene indikerer ofte tilstedeværelse av aromatiske forbindelser. Noen stoffer vil også være fargede i seg selv. Disse stoffene kan avleses uten hjelpemidler da de ses visuelt med det blotte øyet. Omriset av flekkene bør markeres med blyant etter fremkalling da de ofte forsvinner med tiden. Det finnes i tillegg også apparatur for TLC som kan automatisere trinnene i prosessen hele veien fra påsetting til deteksjon [44, 45].

TLC-metoden kan også være en preparativ separasjonsmetode. Dette utføres ved å skrape av de ønskede flekkene fra platen og ekstrahere stoff med egnet løsningsmiddel [45].

Kjemikalier

Diklormetan

Etylacetat

Heksan

Utstyr

TLC-plate

Mikropipette, 10 µl

Elueringskar med tett lokk

Mørkt påvisningsskap med UV-lampe

Prosedyre

1. Ønsket mobilfase lages og overføres til elueringskar med lokk. Karet kan benyttes etter 10-30 minutter for å sikre en mett atmosfære av mobilfasen.
2. Påsettingslinje merkes av på TLC-platen der prøvene skal appliseres (ca. 2 cm fra platekanten og ca. 1 cm avstand mellom hver påsatte prøve).
3. 10 µl prøveløsning appliseres TLC-platen ved hjelp av mikropipette
4. Påsatt løsningsmiddel avdampes ved lufttørking
5. TLC-platen settes deretter vertikalt i elueringskaret inneholdende mobilfase
6. TLC-platen tas ut av karet før mobilfasen migrerer til toppen av platen. Væskefronten merkes av med blyant før mobilfasen fordampes.
8. Mobilfasen på TLC-platen avdampes ved lufttørking.
9. Omrisset av fargede stoffer som blir synlige merkes av med blyant. Fargeløse flekker påvises ved observasjon i UV-lys, både i kortbølget og langbølget UV-lys. Synliggjorte stoffer merkes av med blyant.
10. Platen kan også sprayes med lokaliseringsreagens, eksempelvis med Ceric-reagens (se nedenfor).

Ceric-spraying

Prinsipp

Ceric-reagens oksiderer organiske forbindelser [46].

Kjemikalier

Cerium(IV)sulfat 1 % løst i 10 % vandig svovelsyre

Utstyr

Varmeskap

Sprayflaske for Ceric-oppløsningen

Avtrekksskap

Prosedyre

1. Ferdigutviklet TLC-plate sprayes med Ceric-reagens i avtrekk
2. TLC-platen legges i varmeskap i 10-15 minutter 100 °C
3. Resultater avleses visuelt og flekkers omriss merkes av med blyant

3.3.2 Nukleær magnetisk resonans spektroskopi (NMR)

Prinsipp

Kjernemagnetisk resonans (Nuclear magnetic resonance, NMR) er en metode som benyttes til å strukturoppklare organiske forbindelser.

NMR benyttes til å måle energiabsorpsjon av molekyler som er plassert i et sterkt magnetfelt. Resultatene fra denne metoden gir informasjon om den strukturelle sammensetningen til kjemiske forbindelser.

Enkelte grunnstoffer som ^1H (proton), ^{19}F , ^{31}P og ^{13}C , har kjerner (protoner) som oppfører seg som om de var magneter, ved at de spinner rundt sin egen akse. Dersom for eksempel forbindelser med ^1H - eller ^{13}C -kjerner settes i et sterkt magnetfelt, samtidig som de bestråles av elektromagnetisk stråling, vil kjernene kunne absorbere tilført energi. Dette skjer ved en prosess som kalles magnetisk resonans. Uten et eksternt magnetfelt vil de magnetiske momentene i kjernen (protonene) ha tilfeldige orienteringer. Ved tilførsel av et eksternt, tilstrekkelig kraftig magnetfelt, vil disse magnetiske momentene innrette seg i en av to mulige orienteringer: α - og β - spinntilstand. Ved α - spinntilstand har kjernenenes momenter orientert seg i samme retning som det tilførte magnetfeltet og ved β -spinntilstand har disse orientert seg mot det eksterne magnetfeltet. Når protonene er orientert i samme retning som magnetfeltet, vil de ha lavere energi enn tilfelle er når de er orientert motsatt vei. Det kreves tilført energi

for å "flippe" protoner med α -spinnstilstand, slik at de blir stående i den mer energirike β -posisjonen. Når denne energien er blitt tilført sier man at kjernen er i resonans med den elektromagnetiske strålingen i radiofrekvensområdet.

For at denne "flippingen" av α -spinnorienterte protoner skal forekomme, må det være tilstede et kraftig eksternt magnetfelt samtidig som protonene blir bestrålt av elektromagnetisk stråling ved en spesifikk frekvens. Ikke alle protoner vil absorbere energi ved samme frekvens i et gitt magnetfelt. Dette vil være avhengig av fordelingen og bevegelsene til elektronene rundt kjerneprotonene. Da disse er ladete partikler, vil det oppstå små magnetfelt (induserte felt) som vil påvirke kjernens "observerte magnetfelt". Stor elektrontetthet og medfølgende induserte felt, vil motvirke det eksterne magnetfeltet. Man sier protonet er skjermet (shielded). Det trengs følgelig mer energi for å "flippe" dette protonet. Samtidig vil protoner med lavere induserte omliggende magnetfelt være mindre energikrevende å "flippe". Man sier disse protonene er uskjermet (deshielded). Graden av elektrontetthet rundt et proton er avhengig av elektronfordelingen rundt kjernen og tilstedeværelsen av elektrontiltrekkende og elektrondonerende grupper andre steder i molekylet. Elektrondonerende grupper vil øke elektrontettheten og vice versa.

Resultatene fra NMR-spektroskopi kommer til uttrykk gjennom et NMR-spektrum. Spekteret inneholder topper som korresponderer med de ulike delene av et molekyl. Toppene oppstår som en reaksjon på de ulike protonene i molekylet, etter at de først har "flippet", men deretter falt tilbake og avgitt energi. X-aksen i spekteret kalles "kjemisk skift" og angis i ppm med symbolet δ . Toppenes plassering langs denne aksen sier noe om magnetfeltstyrken som er nødvendig for at absorpsjon av energi skal forekomme. Protoner som absorberer ved lav magnetfeltstyrke sies å komme "downfield" i spekteret og sees på venstre side. Dette er protoner som er deshielded og som dermed har lav elektrontetthet rundt seg. Likedan vil protoner som er shielded bare kunne absorbere energi ved høyere magnetfelt, noe som gjør at toppene fremkommer "upfield" og til høyre.

^1H NMR er den mest brukte formen for NMR, etterfulgt av ^{13}C NMR. I ^1H NMR vil det oppstå signaler i spektrene for alle protoner som befinner seg i unike magnetiske miljøer. Dette betyr at symmetri i et molekyl vil redusere antall signaler, da signalene vil oppstå akkurat samme sted. Ved analyse av et ^1H NMR-spekter er det særlig fire egenskaper som er viktig å studere: kjemisk skift, toppareal (integral), signalsplitting og koblingskonstant. Kjemisk skift-verdier gir verdifulle opplysninger om det magnetiske miljøet, mens topparealet

forteller oss om det relative antallet H-atomer bak signalet. I ^1H NMR er det slik at toppenes areal er proporsjonale med antall H-atomer som produserte signalene. Ved å integrere arealene kan man enkelt sammenligne antall protoner bak de ulike signaltoppene. Signalsplitting er svært viktig for å identifisere ulike deler av et molekyl; dette oppstår når ett sett ekvivalente hydrogenatomer befinner seg innenfor 2-3 atombindinger til andre, ikke-ekvivalente hydrogenatomer. Signalene kan "koble" og det oppstår et forutsigbart splittemønster av signaler. Splittingen av topper er vanligvis summen av $n+1$ -regelen, hvor n er antallet ikke-ekvivalente hydrogenatomer som kobler med de som produserte signalet. En topp kalles singlet, to topper dublett, tre topper triplett og mer enn fire topper benevnes ofte som en multipllett. I et ^{13}C -spekter ser man vanligvis ingen koblinger, og man finner igjen det samme antall ^{13}C i ulike magnetiske miljøer, som enkelttopper. I signaler som er splittet på grunn kobling til andre kjerner, blir avstanden mellom de splittede toppene kalt koblingskonstant. Denne avstanden måles i Hertz og benevnes med bokstaven J . Avstanden er som regel i området 0-18 Hertz. De splittede signalene til kjerner som påvirker hverandre vil ha lik koblingskonstant, og disse kan sammenlignes for å identifisere koblende protoner. Dette forenkler tolkningen av kompliserte spektre.

^{13}C NMR spektre viser vanligvis karbonatomene som singletter. De er spredt ut over et mye større område enn ^1H spektret, vanligvis 0-220 ppm mot 0-14 ppm. I en variant av ^{13}C spektret, APT (Attached Proton Test), gir CH_2 -grupper og kvaternære C positive signaler, mens CH- og CH_3 -grupper gir negative signaler. Dette kan være svært nyttig for fortolkning av spektrene.

^1H og ^{13}C NMR er klassiske former for NMR-spektroskopi og kalles gjerne 1-dimensjonell spektroskopi. Det finnes også mer avanserte metoder som 2-dimensjonell spektroskopi som kan gi ytterligere svar på hvordan et molekyl er bygget opp. Et 2-dimensjonelt ^1H NMR spekter kalles COSY og er svært nyttig for å identifisere proton-proton-koblinger. Spektret består av to ordinære spektre langs x- og y-aksen, mens en diagonal linje viser spektrenes felles topper. Andre topper i x-y-feltet som står loddrett og vannrett på to av punktene i diagonal linjen, viser at de to ^1H -gruppene bak diagonalpunktene kobler med hverandre.

HSQC er også et 2-dimensjonelt spekter, men her er et ^{13}C -spekter vist på den eneaksen og et ^1H -spekter på den andre. Ved bruk av denne metoden kan man observere hvilke hydrogenatomer som er bundet til hvilke karbonatomer. I x-y-feltet ser man krysspunkter, og dersom man fra et punkt følger en rett linje til begge de representative aksene, indikeres det at

hydrogenet som ga opphav til ^1H NMR signalet er bundet til karbonet som ga opphav til ^{13}C signalet.

Kjemikalier

Deuterert løsningsmiddel tilsatt 1 % TMS som referansesubstans

Utstyr

NMR-spektrometer

NMR-rør

Prosedyre

1. En liten mengde prøve (vanligvis 2-50 mg) løses i ca. 1 ml egnet deuterert løsningsmiddel
2. Denne prøveløsningen overføres til NMR-rør
3. Prøven analyseres i NMR-spektrometeret

3.4 Metoder for måling av biologisk aktivitet

3.4.1 Rekellarvetest (Brine shrimp lethality assay)

Prinsipp

Rekellarvetesten er en nyttig testmetode for å måle de toksiske egenskapene hos planteekstrakter og isolerte naturstoffer. Målet er å finne LD₅₀-verdien til planteekstraktet, verdien som representerer stoffkonsentrasjonen ved 50 % dødelighet. I korte trekk utføres testen utføres ved at et kjent antall nyklekkede rekellarver i saltvann blir tilsatt ulike konsentrasjoner stoff. Deretter telles antall overlevende rekellarver 24 timer etter tilsetning.

Metoden har flere fordeler da den er rimelig, rask å utføre og krever ikke dyrt eller spesielt utstyr. Rekellarvegg er også lett tilgjengelige, blant annet i dyrebutikker som mat til tropiske fiskearter. I tillegg har rekellarvene en bemerkelsesverdig evne til å tolerere endringer i miljø. De er ikke sensitive for store fluktuasjoner i vannets saltinnhold. Rekellarvene tolererer også varierende vanntemperaturer mellom 6-37 °C. Optimal temperatur er imidlertid rundt 25 °C eller romtemperatur. På den andre side er selve utklekkingen av rekellarver et kritisk punkt. Rekellarvene klekker ut dersom visse faktorer er tilstedet; temperaturen i vannet bør være rundt 30 °C og saltkonsentrasjonen ikke for høy. [38, 47].

Kjemikalier

DMSO

Destillert vann

Kunstig havsalt (Aqua-Biosal)

Podofyllotoksin

Rekellarvegg (*Artemia salina*)

Utstyr

Reagensglass

Klekkekammer

Lampe

Magnetrorer

Prosedyre

Dag 1

1. 3,3 % saltvannsløsning lages ved å blande kunstig havsalt og destillert vann.
Blandingen kan røres med magnetrorer for at saltet skal løses raskere.
2. Rekearvenes klekkekammer fylles med saltvannsløsning.
3. En spatelskje rekearveegg tilsettes.
4. En lampe plasseres over klekkekammeret ved romtemperatur.
I løpet av 2 dager vil rekearveeggene klekkes.

Dag 3

1. Prøveløsninger lages. Substansene løses i DMSO til ønsket konsentrasjon.
2. Prøveløsning (50 µl) tilsettes hvert reagensglass. Det lages 3 paralleller for hver konsentrasjon.
3. Positiv kontroll: 3 reagensglass tilsettes 50 µl podofyllotoksin (50 mg/ml løst i DMSO).
4. Negativ kontroll: 3 reagensglass tilsettes 50 µl DMSO (1 %).
5. Ca. 4 ml saltvannsløsning tilsettes alle reagensglassene.
6. Saltvannsløsning med innhold av 10 levende rekearver tilsettes alle reagensglassene.
7. Reagensglassene fylles opp med saltvannsløsning til 5 ml.
8. Et lokk settes over alle reagensglassene.
9. Reagensglassene settes i henstand i 24 timer under lys ved romtemperatur.

Dag 4

1. Antall døde rekellarver for hvert reagensglass noteres.
2. 100 μ l metanol tilsettes til hvert reagensglass for å drepe de gjenlevende rekellarvene.
3. LD₅₀-verdien beregnes for hver prøve.

3.4.2 Testing på *Anopheles*-mygg

I denne studien var målet å undersøke og sammenligne de toksiske effektene hos ulike renstoffer fra *Z. heitzi* på myggarten *Anopheles gambiae*. Studien ble utført på to ulike stadier i myggens livssyklus; larvestadiet og voksent myggstadie. For å avklare om et middel har insekticide effekter, kan tester utføres som innebærer at myggen blir utsatt for en direkte og påtvunget kontakt med insektmiddelet. I de kommende avsnittene vil to relevante tester ved navn Topikal test og Mygglarvetest beskrives.

Definisjon på død mygg

En mygg er klassifisert som død eller bevisstløs dersom den er immobil, ikke er i stand til å stå oppreist eller å lette. Avgjørelsen om myggen er død eller bevisstløs baseres på tidspunktet for når den blir observert etter applikasjon. Dødeligheten bestemmes etter minst 24 timer fra applikasjon av middelet på myggen. Beholderen (plastkoppen) som myggen befinner seg i kan bankes på for å stimulere til bevegelse hos eventuelle overlevende eller halvdøde individer.

Tabell 3. Tabellen viser klassifisering av mygg som levende, halvdød eller død i bioassays [48].

Levende mygg	<i>Bevisstløs/halvdød mygg ved observasjon etter 60 minutter</i> <i>Død mygg ved observasjon etter 24 timer</i>	
	Halvdød mygg	Død mygg
<ul style="list-style-type: none">• Kan stå oppreist• Kan fly• Koordinerte	<ul style="list-style-type: none">• Kan ikke stå oppreist; mangler 1 eller 2 bein• Ukoordinerte flygebevegelser	<ul style="list-style-type: none">• Ingen livstegn• (Kan ikke stå)

flygebevegelser	<ul style="list-style-type: none"> • Ligger på ryggen og beveger vinger og bein, men kan ikke lette • Kan lette, men mister raskt høyde 	
-----------------	---	--

Topikal test

Reagenser

Aceton

CO₂ - gass

Utstyr

Et bur med fastende hunnmygg i alderen 2-5 dager

En kjølig plate (ca. 4 °C)

Veieskip

Pensler

Plastkopper dekket med et nett

Pasteurpipetter med en mikrokapillær-spiss

To bakker

Pinsett

Boks med åpning (for innførsel av CO₂-gass)

Klimaskap som holder 26 - 28 °C med luftfuktighet mellom 80 og 100 %.

Prinsipp

Ved topikal testing av voksen mygg appliseres valgt insektmiddel ved direkte kontakt på myggens nakke. Denne metoden er vanlig praksis ved testing på store insekter, som for eksempel veggdyr, fluer og mygg. Dette gjøres for å avklare om middelet har insektdrepende

egenskaper. Etter 24 timer utføres en avlesning der antall overlevende mygg telles. Disse dataene kan videre brukes for å beregne insektmiddelets letale dose (LD_{50}).

Ønsket substans blir oppløst i aceton - et meget flyktig organisk løsningsmiddel som ikke forblir i kontakt med myggens kropp ved applikasjon. Til negativ kontroll benyttes kun aceton [49, 50].

Forarbeid

1. Isbiter tilsettes i en bakke opp til $\frac{3}{4}$ høyde. Oppå legges en ny bakke, samt et ark som limes fast på bunnen av denne.
2. Mygg suges ut av buret og overføres til en boks med tilførsel av CO_2 -gass.
3. Myggene gasses med CO_2 i ca. 40 sekunder slik at de besvimer.
4. Tilførselen av CO_2 stanses, og boksen tettes. Vent i 30 sekunder. Dersom myggene er bevisstløse kan de puttes oppi ovennevnte bakke.
5. Hunnmygg separeres fra hannmygg.
6. 50 hunnmygg veies. Gjennomsnittsvekten av myggen beregnes
7. 25 hunnmygg plukkes ut ved hjelp av pinsett og pensel, og legges deretter i et veieskip. Mygg som ved uhell mister vinger, bein eller andre kroppsdelar kan ikke benyttes videre i testen.
8. Hunnmyggene overføres til en kjølig plate ved hjelp av veieskipet. De holdes rolige og bevegesløse ved hjelp av den kjølige platen som holder omtrent $4^\circ C$.
9. Pensel og pinsett brukes varsomt for å posisjonere myggene for å tilrettelegge applisering av middelet.
10. $0,1 \mu l$ prøveløsning appliseres nøyaktig på myggens fremre ryggplate (dorsal overflate av pronotum). Et forhåndskalibrert mikropipett benyttes for å muliggjøre deponeringen av insektmiddel på $0,1 \mu l$.

Prosedyre (A)

Negativ kontroll:

A.1. 2 kopper à 25 hunnmygg lages initialt der prøveløsning erstattes med ren aceton og appliseres slik som beskrevet i trinnene A.5 og A.7 - A.8.

Prøve:

A.2 Pasteur-pipetten med mikrokapillærspiss benyttes for å applisere en dråpe (0,1 µl) prøveløsning på toppen av myggens pronotum.

A.3. For hver konsentrasjon av prøveløsningen utføres 2 serier (= 2 kopper) à 25 mygg.

A.4. Myggene overføres til en plastkopp dekket av et nett ved hjelp av pensel, pinsett og veieskip. Hele arbeidet med myggen må skje så raskt som mulig, men også presist, da myggene etter hvert vil våkne og kan fly vekk fra arbeidssonen.

A.5. En bomullsdott dynket i sukret væske, eksempelvis vandig honningoppløsning, legges oppå koppens nett. Bomullsdotten må ikke være for tørr og heller ikke dryppende våt da myggene kan klistre seg fast til væsken og bidra til feiltelling. Dette, fordi myggens bevegelser kan hemmes og forveksles med en halvdød/død mygg.

A.6. Gjenta de ovennevnte trinnene så mange ganger som nødvendig for å oppnå et ønsket antall serier mygg for hver konsentrasjon av insektmiddelet.

A.7. Kopper med mygg settes i klimaskap.

A.8. Etter 24 timer telles antall døde mygg.

For at testen skal være validert, må dødeligheten i negativ kontroll være under 20 %.

Mygglarvetest

Prinsipp

Larvetesten er utviklet for å vurdere larvenes følsomhet ovenfor et bestemt insektmiddel. Testen kan utføres på larver ved ulike stadier, men i denne studien ble larvetesten utført på

larver ved stadium 3. Det må plukkes ut larver fra samme stadium for å sikre god reproduserbarhet av resultatene. Dette innebærer at man kan differensiere mellom larvenes ulike stadier og plukke ut ønskede larver ved visuell observasjon. Larvene har ved forskjellige stadier ulike egenskaper, og følgelig påvirkes de forskjellig ved tilsetning av prøveløsning. Ved puppestadiet, eksempelvis, er konsumeringen av omliggende næring minimal, og sannsynligheten for at disse vil innta tilført prøveløsning er følgelig svært liten. Dette gjør pupper dårlig egnet til en slik test, og derfor benyttes larver ved tidligere stadier.

Konsentrasjonsområdet for testløsningene forsøkes valgt slik at verdier som gir over og under 50 % dødelighet testes, og hvis mulig også konsentrasjon som gir 100 % dødelighet.

Som negativ kontroll brukes 1 % vandig etanol.

Koppene blir deretter plassert i en ovn for standard betingelser for varme mellom 26 og 28 °C. Lesningen blir gjort etter 24 timer [49, 50].

Reagenser

Osmotisk vann

Aktuelle prøveløsninger

Materiale

Larver i stadie 3 (L3)

Plastkopper

Pasteur-pipette

Liten sil

Prosedyre (B)

Negativ kontroll:

B.1. En serie på 4 plastkopper benyttes. 99 ml deionisert vann til settes per kopp.

B.2. Tilsetning av mygglarver utføres som beskrevet i trinn 4-8.

B.3. 1 ml etanol tilsettes per kopp

Prøve:

B.4. 99 ml osmotisk vann fylles i en plastkopp. En serie på 4 plastkopper benyttes for hver konsentrasjon av prøveløsning som skal testes.

B.5. 20 larver på slutten av stadium 3 (L3) og begynnelsen av larvestadium 4 (L4) plukkes ut og tilsettes hver kopp. Bruk pasteurpipette for å plukke ut ønskede larver. En sil benyttes for å samle opp larvene, samt for å la vann renne av slik at sluttkonsentrasjonen i koppen med osmotisk vann ikke endres.

B.6. 1 ml prøveløsning med ønsket konsentrasjon tilsettes de 4 koppene.

B.7. Koppene plasseres i et klimaskap.

B.8. Antall overlevende mygglarver telles.

4 Eksperimentell utførelse

4.1 Kjemiske studier

4.1.1 Generell utførelse

Separasjon av fraksjoner ble utført ved VersaFlash-kolonneseparasjon eller separasjon på kromatotron. For å kunne avdekke hvilke fraksjoner som kunne slås sammen, ble analytisk TLC benyttet. Her ble TLC-platene etter endt utvikling og tørking, observert i kort- og langbølget UV-lys, henholdsvis ved 254 nm og 366 nm. Videre ble platene sprayet med ceric (ceriumsulfat i vandig svovelsyre) og plassert i varmeskap ved 105 °C i 10-15 minutter. Etter sammenslåing av fraksjonene ble hovedfraksjonene dampet inn på rotavapor og oljepumpe, og veid. For fraksjoner som det ble tatt opp ^1H NMR- og ^{13}C NMR – spektra av, ble prøvene løst i deuterert kloroform med TMS tilsatt som intern standard. Denne prosedyren gjelder for samtlige fraksjoner beskrevet nedenfor i dette avsnittet, og vil derfor ikke beskrives på nytt. For noen fraksjoner ble HPLC benyttet, både analytisk og preparativt.

4.1.2 Plantemateriale

Utgangsmaterialet var bark fra treet *Zanthoxylum heitzii*. Plantematerialet ble samlet inn og identifisert av Bertin Mikolo, Université Marian Ngouabi, Brazzaville, Republikken Kongo, i november 2011 i Douakani, Kongo. Det lufttørkede plantematerialet ble sendt til Norge, brukket i småbiter og malt på knivmølle (4 mm sikt). Prøver av det brukte plantematerialet er deponert ved Farmasøytisk institutt, avdeling for farmasøytisk kjemi, seksjon farmakognosi (registreringsnummer ZH-B-111202).

4.1.3 Ekstraksjon av plantemateriale

Barken av *Z. heitzii* ble ekstrahert i Soxhletapparat. Ekstraksjonen ble fordelt på tre batcher på 294 g, 297 g og 301 g grunnet for liten plass til alt plantematerialet i papphylsen til Soxhlet-apparatet. Hver batch ble ekstrahert med 3 L heksan i 10 timer, med henstand i heksan over natten mellom ekstraksjonene. Denne prosessen strakk seg over 3 dager. Etter ekstraheringen

ble heksanløsningen filtrert gjennom filterpapir, dampet inn på rotavapor og ettertørket på oljepumpe.

Det heksanekstraherte plantematerialet ble ekstrahert på tilsvarende måte med etylacetat og deretter med etanol. Ekstraktene ble filtrert, dampet inn på rotavapor og oljepumpe, og veid.

NMR-spektroskopi

Heksanrækstraktet ble analysert ved hjelp av ^1H - og ^{13}C APT- spektrum i CDCl_3 . Se vedlegg A, side 149. Spektra av etylacetat- og etanolekstrakter er ikke vist, siden det ikke ble gjort noe mer arbeid med disse ekstraktene.

4.1.4 Fraksjonering av heksanrækstraktet

Heksanekstraktet ble kromatografert på en VersaPak-kolonne (110x300 mm, normalfase silikagel). Kolonnen ble kondisjonert med heksan-diklormetan (1:1). Heksanrækstraktet (ca. 21 g) ble løst i ca. 100 ml diklormetan. En del av rækstraktet ble filtrert gjennom glassinter og noe ble filtrert gjennom filterpapir. Det filtrerte ekstraktet ble videre applisert på kolonnen. Som mobilfase ble det benyttet heksan-diklormetan (1:1), diklormetan, diklormetan med økende mengder etylacetat, ren etylacetat og til sist ren aceton

Totalt 37 fraksjoner à 0,15 – 0,5 L ble mottatt. Fraksjonene ble samlet opp ut fra farge på eluatet.

Analytisk TLC

De ovennevnte fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC, se punkt 3.3, s.33. Benyttede elueringsmidler var diklormetan og etylacetat. Fraksjonene ble slått sammen til 15 hovedfraksjoner (V1-V15) på basis av TLC-resultatene. Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 118.

^1H NMR

^1H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.5 Fraksjonering av fraksjon V3

VersaFlash-kolonne-separasjon

Fraksjon V3 (ca. 1,4 g) ble løst i ca. 8 ml diklormetan og applisert på en Versapak-kolonne (40x150 mm, sfærisk silikagel normalfase) forhåndskondisjonert med diklormetan. Mobilfasene besto av diklormetan og etylacetat. Elueringen ble utført med ren diklormetan, gradient diklormetan-etylacetat fulgt av ren etylacetat. Det ble samlet totalt 42 fraksjoner à 60 ml og 100 ml for henholdsvis fraksjon 1-40 og fraksjon 41.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttede elueringsmidler var både diklormetan og etylacetat. Fraksjonene ble slått sammen til 13 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V3V1-V3V13). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 119.

^1H NMR

^1H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.6 Fraksjonering av fraksjon V3V2

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V3V2 (ca. 65 mg) ble løst i ca. 2 ml diklormetan og applisert på en 1 mm kromatotronplate forhåndskondisjonert med diklormetan. Mobilfasene besto av diklormetan og etylacetat. Elueringen ble utført med diklormetan og diklormetan-etylacetat (80:20, deretter 60:40). Det ble samlet totalt 12 fraksjoner à 12 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan. Fraksjonene ble slått sammen til 6 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V3V2C1-V3V2C6). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 120.

^1H NMR

^1H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.7 Fraksjonering av fraksjon V3V6

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V3V6 (ca. 350 mg) ble løst i ca. 1 ml diklormetan og applisert på en 2 mm kromatotronplate forhåndskondisjonert med diklormetan. Mobilfasene besto av diklormetan og etylacetat der elueringen ble utført først med diklormetan og deretter etylacetat. Det ble samlet totalt 21 fraksjoner à 12 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan. Fraksjonene ble slått sammen til 5 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene V3V6C1-V3V6C5. Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 121.

^1H NMR

^1H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

^{13}C NMR

^{13}C NMR-spektra ble tatt opp av alle de sammenslåtte fraksjonene, utenom V3V6C1.

4.1.8 Fraksjonering av fraksjon V4 og V5 supernatant

VersaFlash-kolonneseparasjon

Ved henstand dannet det seg krystaller i fraksjon V4 og V5. Supernatanten fra begge fraksjonene (ca. 1,2 g) ble slått sammen og løst i 10,5 ml diklormetan. Supernatantløsningen ble deretter filtrert (Schleicher & Schüll 589 papir) og applisert på en VersaPak- kolonne (40x150 mm, silikagel normalfase) forhåndskondisjonert med diklormetan. Kolonnen ble eluert med diklormetan og deretter med gradient diklormetan-etylacetat fulgt av ren etylacetat. Det ble samlet totalt 34 fraksjoner à 30 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (94:6). Fraksjonene ble slått sammen til 11 hovedfraksjoner på basis av TLC-

resultatene (V4-V5supernatantV1- V4-V5supernatantV1V11). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 122.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.9 Fraksjonering av fraksjon V4-V5supernatantV4

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V4-V5supernatantV4 (ca. 160 mg) ble løst i ca. 2 ml diklormetan og applisert på en 2 mm kromatotronplate forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen ble utført med diklormetan og deretter gradient diklormetan-etylacetat (forhold mellom løsningsmidlene) fulgt av etylacetat. Det ble samlet totalt 33 fraksjoner à 12 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttede elueringsmidler var diklormetan og etylacetat i ulike blandingsforhold. Fraksjonene ble slått sammen til 13 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene. Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, s.123.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.10 Fraksjonering av fraksjon V4-5supernatantV5

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V4-V5supernatantV5 (ca. 95 mg) ble løst i ca. 2 ml diklormetan og applisert på en 1 mm kromatotronplate forhåndskondisjonert med diklormetan. Mobilfasen besto av diklormetan-etylacetat der elueringen ble utført med økende andel etylacetat. Det ble samlet totalt 29 fraksjoner à 12 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttede elueringsmidler var diklormetan og etylacetat i ulike blandingsforhold. Fraksjonene ble slått sammen til 9 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene V4-V5supernatantV5C1- V4-V5supernatantV5C9. Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 124.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.11 Fraksjonering av fraksjon V6 og V7

VersaFlash-kolonneseparasjon

Fraksjon V6 og V7 ble slått sammen (totalvekt 2,05 g), løst i ca. 6 ml diklormetan og applisert på en VersaPak-kolonne (40x150 mm, silikagel normalfase) forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen foregikk med diklormetan, diklormetan-etylacetat (80:20) og etylacetat. Det ble totalt samlet 35 fraksjoner à 15 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (90:10). Fraksjonene ble slått sammen til 9 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V6-7V1-V6-7V9). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 125.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.12 Fraksjonering av fraksjon V6-7V2

VersaFlash-kolonneseparasjon

Fraksjon V6-7V2 (ca. 1,2 g) ble løst i ca. 6 ml diklormetan og applisert på en VersaPak-kolonne (40x150 mm, silikagel normalfase) forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen foregikk med diklormetan-etylacetat (96:4, deretter 90:10). Det ble totalt samlet 42 fraksjoner à 15 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (95:5). Fraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V6-V7V2V1- V6-V7V2V8). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 126.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.13 Fraksjonering av fraksjon V6-7V2V4

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V6-V7V2V4 (ca. 160 mg) ble løst i ca. 5 ml diklormetan og applisert på en kromatotronplate (2 mm) forhåndskondisjonert med heksan-etylacetat (95:5). Mobilfasen besto av heksan-etylacetat der elueringen ble utført med økende andel etylacetat. Det ble samlet totalt 29 fraksjoner à ca. 15 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var heksan-etylacetat (85:15). Fraksjonene ble slått sammen til 5 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V6-V7V2V4C1- V6-V7V2V4C5). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 127.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene, utenom V6-V7V2V4C1 og V6-V7V2V4C5.

4.1.14 Fraksjonering av fraksjon V6-7V2V5

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V6-V7V2V5 (ca. 200 mg) ble løst i ca 3 ml diklormetan og applisert på en kromatotronplate (2 mm) forhåndskondisjonert med heksan-etylacetat (95:5). Mobilfasen besto av heksan-etylacetat der elueringen ble utført med økende andel etylacetat. Det ble samlet totalt 30 fraksjoner à 15 ml og 75 ml for henholdsvis fraksjon 1-29 og fraksjon 30.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var heksan - etylacetat (85:15). Fraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V6-V7V2V5C1- V6-V7V2V5C8). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 128.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene, utenom hovedfraksjon 1, 6 og 8.

4.1.15 Fraksjonering av fraksjon V6-7V9

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V6-V7V9 (ca. 100 mg) ble løst i ca. 8 ml diklormetan og applisert på en kromatotronplate (1 mm) forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen ble utført med gradient diklormetan-etylacetat. Det ble samlet totalt 29 fraksjoner à 12 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (80:20). Fraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V6-V7V9C1- V6-V7V9C8). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 129.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.16 Fraksjonering av fraksjon V9 og V10

VersaFlash-kolonne-separasjon

Fraksjon V9 og V10 (ca. 3,2 g totalt) ble løst i henholdsvis ca. 6 ml og ca. 3 ml diklormetan, slått sammen og applisert på en Versapak-kolonne (40x150 mm, silikagel normalfase) som var forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen ble utført med diklormetan-etylacetat (90:10, deretter 85:15) fulgt av ren etylacetat. Det ble samlet totalt 24 fraksjoner à 30 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (95:5). Fraksjonene ble slått sammen til 9 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V9-V10V1-V9-V10V9). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 130.

¹H NMR

¹H NMR spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.17 Fraksjonering av fraksjon V14

VersaFlash-kolonneparasjon

Fraksjon V14 (ca. 0,7 g) ble løst i ca 10 ml diklormetan. En mindre del (ca. 50 mg) løste seg ikke og ble frafiltrert. Resten ble applisert på en Versapak-kolonne (40x150 mm, silikagel normalfase) forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen ble utført først med ren diklormetan og deretter med gradient diklormetan-etylacetat fulgt av ren etylacetat. Totalt 42 fraksjoner ble samlet à 30 ml og 60 ml, henholdsvis for fraksjon 5-34 og fraksjon 1-4, 35-42.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttede elueringsmidler var både diklormetan og etylacetat (50:50). Fraksjonene ble slått sammen til 11 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V14V1-V14V11). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 131.

¹H NMR

^1H NMR-spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene. Etter kort vasking av bunnfallet med DCM ble dette også tatt spektrum av.

^{13}C NMR

^{13}C NMR-spektra ble tatt opp av de mest interessante fraksjonene ut fra ^1H NMR. De sammenslåtte fraksjonene 5, 7, 10 og bunnfall.

4.1.18 Fraksjonering av fraksjon V14V7

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V14V7 (ca. 90 mg) ble løst i ca. 3 ml kloroform og applisert på en kromatotronplate (1 mm) forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen ble utført med gradient diklormetan-etylacetat fulgt av ren etylacetat. Det ble samlet 34 fraksjoner à 12 ml (1-34) og en fraksjon à 50 ml (fraksjon 35).

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (80:20). Fraksjonene ble slått sammen til 8 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V14V7C1-V14V7C8). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 132.

^1H NMR

^1H NMR-spektra ble tatt opp av de sammenslåtte fraksjonene.

4.1.19 Fraksjonering av fraksjon V14V8

Sentrifugal akselerert TLC (CA-TLC)

Fraksjon V14V8 (ca. 80 mg) ble løst i ca. 3 ml kloroform og applisert på en kromatotronplate (1 mm) forhåndskondisjonert med diklormetan. Elueringen ble utført med diklormetan og gradient diklormetan-etylacetat (forhold?). Det ble samlet totalt 41 fraksjoner à 12 ml.

Analytisk TLC

Fraksjonene ble undersøkt ved analytisk TLC. Benyttet elueringsmiddel var diklormetan - etylacetat (80:20). Fraksjonene ble slått sammen til 6 hovedfraksjoner på basis av TLC-resultatene (V14V8C1- V14V8C6). Detaljer for kromatograferingen er vist i vedlegg 9.1, side 133.

^1H NMR

^1H NMR-spektra ble tatt opp av V14V8C3 og V14V8C5.

4.2 Analytisk HPLC

Analytisk HPLC ble utført på følgende fraksjoner:

V3V9-12; V6-7V9K3-8; V14V7K4-5; V14V8K3; V14V8K5

Fraksjonene ble løst i 50 % acetonitril til en konsentrasjon på ca. 20-30 µg/ml. Fra autosamplere ble det injisert 20 µl på en C18- kolonne (250x4,6mm). Deteksjon ble foretatt i bølgelengdeintervallet 200-500 nm. Det ble valgt å analysere bølgelengden ved 240 nm da preliminære studier har vist stoffer med absorpsjonsmaksimum ved denne frekvensen. Mobilfasens sammensetning var den samme som ved preparativ HPLC, altså acetonitril og vann, gradientforholdet er vist i Tabell 4. Mobilfasehastigheten var 1 ml/min.

Tabell 4. Gradientsystem for analytisk HPLC.

Tid (min)	% vann (A)	% acetonitril (B)
0-2	60	40
2-15	60-5	40-95
15-25	5	95
25-26	5-60	95-40
26-35	60	40

4.3 Preparativ HPLC

På bakgrunn av resultater fra analytisk HPLC og NMR ble følgende fraksjoner slått sammen:

V6-7V9K4 + V6-7V9K5; V3V9 + V3V10; V14V8K3 + V14V7K4 + V14V7K 5.

De sammenslåtte fraksjonene ble renset opp ved preparativ HPLC. Etter fraksjonering med preparativ HPLC ble utvalgte fraksjoner dampet inn til tørrhet, veid og analysert ved NMR.

Preparativ HPLC av fraksjon V6-7V9K4-5

Fraksjon V6-7V9K4-5 (ca. 20 mg) ble løst i acetonitril-vann (50:50) til et volum på 1 ml. Denne prøveløsningen ble videre filtrert og injisert i en 2 ml loop. Deteksjon ble foretatt ved bølgelengden 237 nm. Det ble benyttet en C18-preparativ HPLC kolonne (250x21,4mm). Mobilfasehastigheten var 20 ml/ml der mobilfasen besto av acetonitril og vann. Elueringen ble utført med gradient acetonitril-vann, se Tabell 5. Det ble samlet totalt 11 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet underveis i kjøringen.

Preparativ HPLC av fraksjon V3V9-10

Fraksjon V3V9-10 (ca. 22 mg) løst i acetonitril-vann (50:50) til et volum på 1 ml. Denne prøveløsningen ble videre filtrert og injisert i en 2 ml loop. Deteksjon ble foretatt ved bølgelengden 237 nm. Det ble benyttet en C18-preparativ HPLC kolonne (250x21,4mm). Mobilfasehastigheten var 20 ml/min der mobilfasen besto av acetonitril og vann. Elueringen ble utført med gradient acetonitril-vann, se Tabell 5. Det ble samlet totalt 7 fraksjoner basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet underveis i kjøringen.

Preparativ HPLC av fraksjon V14V8K3+V14V7K4-5

Fraksjon V14V8K3+V14V7K4-5 (ca. 16 mg) ble løst i acetonitril-vann (50:50) til et volum på 1 ml. Prøveløsningen ble filtrert og injisert i en 10 ml loop. Kolonnen som ble benyttet var en C18-preparativ HPLC kolonne (250x21,4mm). Mobilfasehastigheten var 20 ml/min og deteksjon av fraksjonen ble foretatt ved bølgelengden 237 nm. Mobilfasen besto av acetonitril

og vann. Elueringen ble utført med gradient acetonitril-vann, se Tabell 5. Det ble samlet totalt 13 fraksjoner, basert på absorbanstopper visualisert i kromatogrammet underveis i kjøringen.

Tabell 5. Gradientsystem for preparativ HPLC av fraksjon V6-7V9K4-5, V3V9-10 og V14V8K3+V14V7K4-5.

Tid (min)	% vann (A)	% acetonitril (B)
0-2	60	40
2-15	60-5	40-95
15-25	5	95

4.4 Biologiske studier

Renstoffene ble videre testet for biologisk aktivitet på rekelarver (*Artemia salina*), *Anopheles gambiae* -mygg og -mygglarver.

De biologiske forsøkene på *Anopheles*-mygg og mygglarver ble utført ved laboratoriet hos IRD (Institut de recherches pour le development) i Montpellier, sør i Frankrike. Her muliggjorde laboratoriefasilitetene utførelsen av tester på malariamygg og -mygglarver. IRD er verifisert av WHO, som er en av deres samarbeidspartnere innen forskning og utvikling. Det øvrige laboratoriearbeidet ble utført på Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo.

4.4.1 Bioassay - Toksisitetsstudier på rekelarver (*Artemia salina*)



Figur 1. Larve av *Artemia salina* [51]

Z. heitzii ble testet for toksiske egenskaper på rekelarver, *Artemia salina*. Toksisitetsforsøket ble utført ved å undersøke heksan-, etylacetat- og metanolekstraktene fra bark og blad, heksanekstraktet av frøene, samt isolerte renstoffer (dihydronitidin, pellitorin, sesamin, caryofyllenoksid, isobauerenol og isoarnottianamid). Toksisitetstesten ble utført ved to

måleserier. I første omgang ble testen utført ved konsentrasjonene 10 mg/ml, 5 mg/ml og 1 mg/ml for bark-, blad- og frøekstrakter. Dette ga henholdsvis sluttkonsentrasjonene 100 µg/ml, 50 µg/ml og 10 µg/ml i reagensglassene (volum 5 ml). De samme konsentrasjonene ble deretter benyttet for alle renstoffene isolert fra heksanbarkekstraktet, utenom pellitorin der anvendte konsentrasjonene var 5 mg/ml, 1 mg/ml og 0,1 mg/ml. Dette ga henholdsvis sluttkonsentrasjonene 50 µg/ml, 10 µg/ml og 1 µg/ml i reagensglassene.

4.4.2 Bioassay – Toksisitetsstudier på malariamygg (*Anopheles gambiae*)

Topikal myggtest

Oppimot 10 000 hunnmygg ble testet i forbindelse med bioassay-forsøket ”topikal test”. Her ble 0,1 µl av testløsning bestående av renstoff(ene) og aceton applisert på bevisstløse mygg på deres fremre ryggplate. Myggen som ble testet tilhører en stamme hentet fra Kisumu i Kenya (KIS). Denne *Anopheles gambiae*-stammen har, utenom dieldrin, ikke vist tegn til resistens mot insektmidler tidligere[52]. Isolerte renstoffer fra *Z. heitzii* bark, og en blanding av disse, ble benyttet som testsubstanser og undersøkt på mygg. Renstoffene var caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin, og disse ble løst i aceton. Blandingen som ble testet inneholdt renstoffer i et forhold tilnærmet lik sammensetningen funnet i *Z. heitzii* heksanbarkekstrakt; 4 % caryofyllenoksid, 31 % dihydronitidin, 26 % sesamin og 39 % pellitorin. Hensikten med å teste blandingen på mygg var for å undersøke eventuell synergisme mellom renstoffene. Flere separate forsøk ble utført for hvert renstoff. Initielt ble det for hvert forsøk laget testløsninger med konsentrasjonene 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L, 100 mg/L, 1000 mg/L, i noen tilfelle også 10 000 mg/L, som tilsvarte en applisert mengde rensustans på henholdsvis 0,01 ng, 0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng og 1000 ng per hunnmygg. Andre konsentrasjoner av testløsningen ble laget og testet på hunnmyggen med det mål å finne LD₅₀, såfremt renstoffet ga interessante resultater initielt. Dersom et renstoff ikke utviste aktivitet ved de ovennevnte konsentrasjonene, ble det ansett som lite aktivt og ble ikke behandlet videre. For hver fortynning ble det utført to paralleller à 25 mygg, i tillegg til negativ kontroll. Etter applikasjon av testløsning ble myggene puttet i sine respektive kopper og som ble lukket med et nett og en gummistrikk. En bomullsdott dynket i 10 % honningoppløsning med deionisert vann ble lagt oppå nettet som føde. Koppene ble deretter satt i et klimaskap og telling av antall døde mygg ble utført etter 24 timer. Det ble utført 9 separate forsøk av renstoffet pellitorin (da det viste seg å ha mest interessante egenskaper), mens det ble utført færre forsøk av de øvrige renstoffene.

Mygglarvetest

Renstoffene caryofyllenoksid, sesamin og pellitorin ekstrahert fra *Z. heitzi*s bark ble testet på omtrent 5000 *Anopheles gambiae*-mygglarver. Det forelå også planer for å teste dihydronitidin, men grunnet løselighetsproblemer i assaysystemet ble dette renstoffet ikke undersøkt på mygglarver. Renstoffene ble løst i etanol, ikke i aceton slik som ved topikal test av mygg. 1 ml prøveløsning med ønsket konsentrasjon ble tilsatt en plastkopp inneholdende 99 ml deionisert vann og 20 larver. For en prøveløsning med én spesifikk konsentrasjon ble det benyttet en serie på 4 kopper. Larver ved andre stadier enn på slutten av stadium 3 og begynnelsen av stadium 4, ble ekskludert før oppstart av testen. Avslutningsvis ble koppene med larver og testsubstans satt i et mørkt rom og antall døde mygglarver ble talt etter 24 timer.

5 Resultater

5.1 Kjemiske studier

Ekstraksjon og fraksjonering av råekstrakt

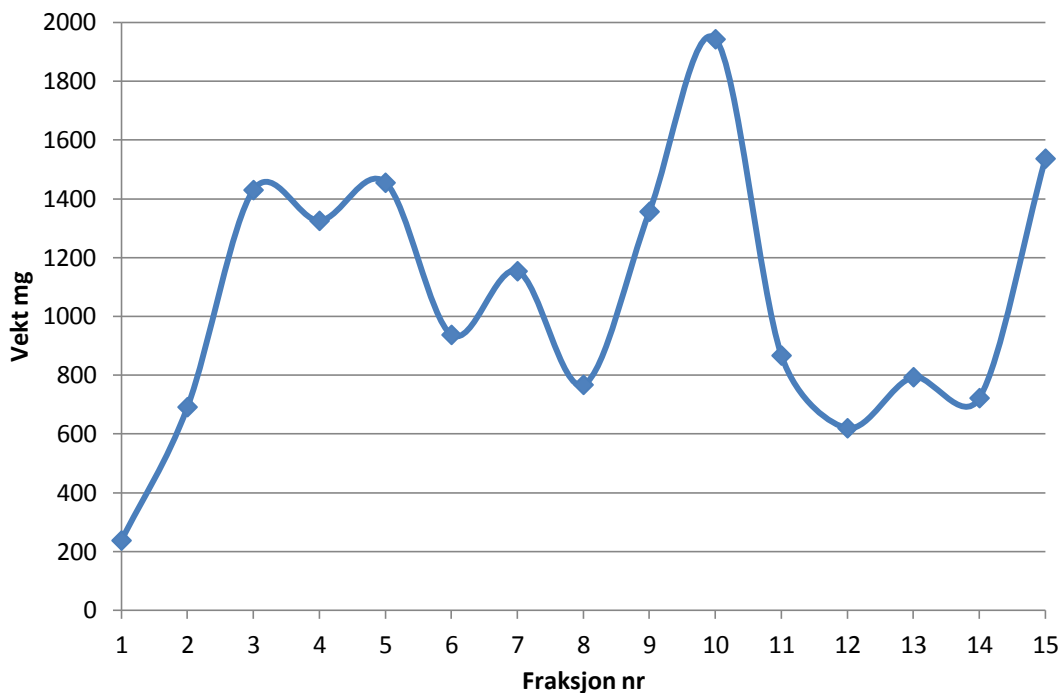
Tørket, oppmalt bark av *Zanthoxylum heitzii* ble ekstrahert i Soxhletapparat med heksan. Det heksanekstraherte plantematerialet ble så ekstrahert på samme måte med etylacetat og etanol, men disse ekstraktene ble (med unntak for testing av toksisitet på rekellarver) ikke studert i denne oppgaven, som var definert å handle om heksanekstraktet. Utbyttene av ekstraktene er imidlertid følgende:

Tabell 6. Utbytte ved ekstraksjon av *Z. heitzii* bark.

Fra 294 g plantemateriale	Totalvekt	Utbytte
Heksan	5,48 g	1,86 %
Etylacetat	1,49 g	0,51 %
Etanol	17,96 g	6,11 %

Heksanekstraksjon ble utført tre ganger, og ga til sammen 15,9 g ekstrakt. Ekstraktet ble kromatografert på en VersaPak silikagelkolonne, fraksjonene ble slått sammen til 15 hovedfraksjoner basert på tynnsjikt-kromatografi, dampet inn på rotavapor og veid og det ble tatt opp ^1H NMR spektra av de sammenslåtte fraksjonene. Ut fra TLC- og NMR-data (se NMR-spektre: vedlegg A, side 149) ble det så bestemt hvilke fraksjoner det skulle gås videre med. Videre opprensing foregikk ved kolonnekromatografi og sentrifugalt akselerert tynnsjikt-kromatografi på en kromatotron, i begge tilfelle med normalfase silikagel som stasjonærfase. Tynnsjikt-kromatografi ble brukt for å bestemme hvilke fraksjoner som skulle slås sammen, og ^1H NMR-spektra ble opptatt av de inndampede fraksjonene. I noen tilfelle ble også andre NMR-spektra opptatt (^{13}C NMR/APT; COSY; HSQC).

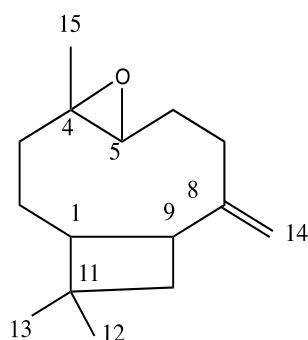
Kromatografi (VersaFlash) av *Z. heitzii* heksanekstrakt Vekt av fraksjoner



Figur 2. Kromatograferingsprofil for kolonnekromatografi av *Z. heitzii* heksan rækstrakt.

Caryofyllenoksid

Fraksjon 3 fra kolonnekromatografering av rækstraktet ble videre renset ved kolonnekromatografi, og fraksjon 6 herfra ble renset på kromatotron. Kromatotronfraksjon 4 så ut til å være ett stoff ved TLC, og det ble tatt opp ^1H NMR, APT, COSY og HSQC spektra av fraksjonen (vedlegg B, s.150-151). Ut fra spektrene ble det antatt at stoffet kunne være et terpenoid. Sesquiterpenet caryofyllenoksid har litteraturdata som stemmer overens med vårt stoff [53, 54].



Figur 3. Caryofyllenoksid

Tabell 7. Caryofyllenoksid ^1H NMR-data.

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
4,97ppm	(1 H, d, J 1,3 Hz)	H-14a
4,86ppm	(1 H, d J 1,3 Hz)	H-14b
2,87ppm	(1 H, dd J 10,7;4,1 Hz)	H-2a
2,61 ppm	(1 H, dd J 9,4;1,5 Hz)	H-9
0,85-2,40 ppm	(mange overlappende multiplerter)	
1,30 ppm	(overlapper med signal ved 1,26 ppm)	
1,20 ppm	(3H, s)	H-15
1,01 ppm	(3H, s)	H-12
0,99 ppm	(3H, s)	H-13

Andre signaler, for eksempel ved 1,26ppm (lang CH_2 -kjede) og 4,1-4,3ppm (glyceryldel av fett) foreligger også. Dette tyder på at stoffet ikke er helt rent.

Tabell 8. Caryofyllenoksid ^{13}C (APT)-data.

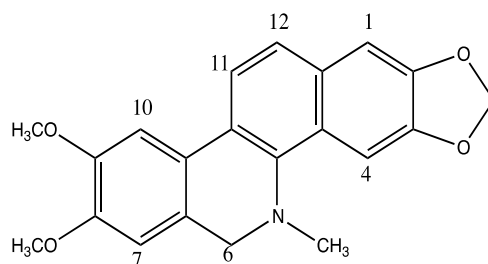
Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
151,7ppm	C	C-8
112,7ppm	CH_2	C-14
63,7ppm	CH	C-5
59,7ppm	C	C-4
50,7ppm	CH	C-1

48,7ppm	CH	C-9
39,7ppm	CH ₂	C-10
39,1ppm	CH ₂	C-7
34,1ppm	C	C-11
30,2ppm	CH ₂	C-6
29,8ppm	CH ₃	C-12
29,8ppm	CH ₂	C-3
27,2ppm	CH ₂	C-2
21,6ppm	CH ₃	C-13
17,0ppm	CH ₃	C-15

Multiplisitet og tilordning av signaler er foreslått ut fra APT-spektrum og editert HSQC-spektrum og sammenligning med litteraturdata.

Dihydronitidin

Fra fraksjon 4 og 5 fra kromatograferingen av råekstraktet krystalliserte det ut et stoff ved henstand. Dette stoffet ble identifisert som alkaloidet dihydronitidin, som var identifisert i innledende forsøk [55] i *Z. heitzii*. Det ble identifisert ut fra ¹H NMR og APT spektre (vedlegg C, side 152).



Figur 4. Dihydronitidin

Tabell 9. Dihydronitidin ^1H NMR-data.

Kjemisk skift	Integral, Multiplisitet, Koblingskonstant	Posisjon i molekylet
7,68 ppm	(1 H, d, J 8,6 cps)	H-11
7,66 ppm	(1 H, s)	H-4
7,48 ppm	(1 H, d, 8,6 cps)	H-12
7,31 ppm	(1 H, s)	H-10
7,11 ppm	(1 H, s)	H-1
6,79 ppm	(1 H, s)	H-7
6,04 ppm	(2H, s)	O-CH ₂ -O
4,13 ppm	(2H, s)	H ₂ -6
3,99 ppm	(3H, s)	OCH ₃
3,95 ppm	(3H, s)	OCH ₃
2,60 ppm	(3H, s)	NCH ₃

Tabell 10. Dihydronitidin ^{13}C (APT)-data.

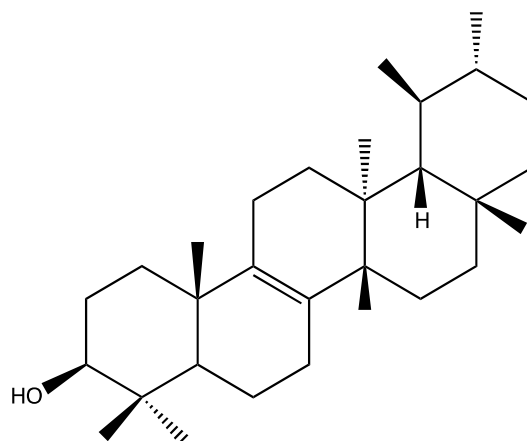
Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
148,9ppm	C	C-2
148,6ppm	C	C-3
148,1ppm	C	C-8
147,5ppm	C	C-9

142,8ppm	C	C-10b
130,8ppm	C	C-12a
126,4ppm	C	C-4a
125,0ppm	C	C-4b
124,5ppm	C	C-10a
124,4ppm	C	C-6a
123,8ppm	CH	C-12
119,9ppm	CH	C-11
110,2ppm	CH	C-7
106,5ppm	CH	C-10
104,3ppm	CH	C-4
101,0ppm	CH ₂	OCH ₂ O
100,6ppm	CH	C-1
56,2ppm	CH ₃	OCH ₃
56,0ppm	CH ₃	OCH ₃
54,8ppm	CH ₂	C-6
41,0ppm	CH ₃	NCH ₃

Disse dataene stemmer med dihydronitidin isolert i tidligere forsøk og med litteratordata [56].

Isobauerenol

Dette stoffet ble isolert fra fraksjon 6-7 fra første kolonne, videre opprenset ved ny kolonnekromatografering og deretter kromatotronseparering av fraksjon 4 fra den andre kolonnen. Ut fra ^1H NMR, APT, COSY og HSQC (vedlegg G, side 150-151) ble det antatt en struktur som ble funnet igjen i litteraturen som isobauerenol.



Figur 5. Isobauerenol

Tabell 11. Isobaureneol. ^1H NMR-spektraldata.

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
0,7-2,2 ppm	mange overlappende signaler	
0,80ppm	(3H, s)	H-24
0,96ppm	(3H, s)	H-25
1,00ppm	(6H, s)	H-23, H-26
1,05ppm	(3H, s)	H-28

0,8-2,1ppm	mange overlappende multipletter	
3,23ppm	(1 H, dd, J 11,6; 4,7)	H-3

Tabell 12. Isobauerenol ^{13}C (APT)-data.

Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
15,6ppm	CH_3	C-27
15,8ppm	CH_3	C-24
19,2ppm	CH_2	C-6
19,3ppm	urenhet?	
19,9ppm	CH_3	C-25
20,6ppm	CH_2	C-11
20,8ppm	urenhet?	
22,2ppm	CH_3	C-26
22,5ppm	CH_3	C-30
24,7ppm	CH	C-2?
25,2ppm	CH	C-15
25,3ppm	CH_2	C-29
26,3ppm	urenhet?	
27,5ppm	CH_2	C-7
27,9ppm	CH_2	C-23
28,1ppm	urenhet?	

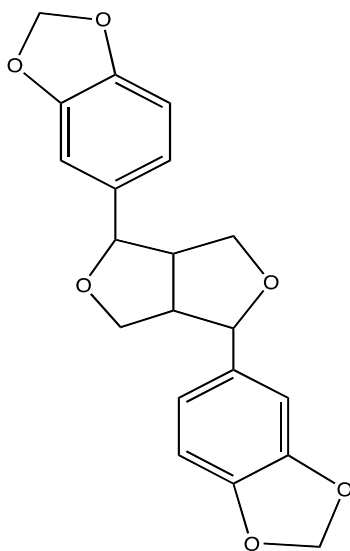
29,1ppm	CH ₂	C-12
29,7ppm	CH ₂	C-21
30,7ppm	urenhet?	
31,5ppm	urenhet?	
31,8ppm	urenhet?	
32,0ppm	CH ₂	C-17, C-19
33,2ppm	CH ₂	C-22
34,2ppm	urenhet?	
34,4ppm	urenhet?	
35,0ppm	CH	C-1
36,0ppm	CH ₂	C-20
36,7ppm	urenhet?	
36,8ppm	urenhet?	
37,6ppm	CH	C-10
37,8ppm	CH	C-4
38,2ppm	CH ₃ /CH	C-28, C-13
38,8ppm	urenhet?	
41,1ppm	C	C-14
44,1ppm	urenhet?	
50,5ppm	CH	C-5
50,7ppm	urenhet?	
52,4ppm	CH	C-18

79,0ppm	CH	C-3
134,2ppm	C	C-9
134,5ppm	C	C-8

Spektrene for vårt stoff stemmer godt med litteraturdata [57, 58], men noen ekstratopper i APT spektret kan tyde på at stoffet ikke er helt rent. Signalene er tilordnet ut fra multiplisitet (APT), koblinger (COSY), C-H bindinger (HSQC) og sammenligning med litteraturdata.

Sesamin

Lignanet sesamin ble isolert fra fraksjon 6-7 fra kromatografering, subfraksjon 2. Rent sesamin ble utkrystallisert etter ny fraksjonering av denne subfraksjonen, se flytskjema (vedlegg D, side 153).



Figur 6. Sesamin

Tabell 13. Sesamin ^1H NMR-data

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
6,78-6,85ppm	(6H, flere m)	H-2', H-2'', H-5', H-5'', H-6', H-6''
5,95ppm	(4H, s,)	2 x OCH ₂ O
4,72ppm	(2H,d, J 4,4)	H-2 β , H-6 β
4,24ppm	(2h,m)	H-4 α , H-8 α
3,88ppm	2H,dd, J 3,6; 9,3)	H-4 β , H-8 β
3,05ppm	(2H, m)	H-1 α , H-5 α

 Tabell 14. Sesamin ^{13}C (APT) NMR-data

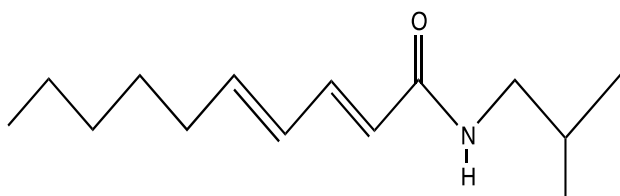
Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
148,0ppm	C	C-3', C-3''
147,1ppm	C	C-4', C-4''
135,1ppm	C	C-1', C-1''
119,3ppm	CH	C-6', C-6''
108,2ppm	CH	C-5', C-5''
106,5ppm	CH	C-2', C-2''
101,1ppm	CH ₂	OCH ₂ O x 2
85,8ppm	CH	C-2, C-6
71,7ppm	CH ₂	C-4, C-8

54,3ppm	CH	C-1, C-5
---------	----	----------

Sesamin ble identifisert og signalene i spektrene tilordnet ved sammenligning av ^1H NMR og APT spektra med tidligere isolert materiale fra *Z. heitzii*[55] og litteraturlata [59].

Pellitorin

Amidet pellitorin var spredt over flere fraksjoner etter kromatografering av råekstraktet. Fraksjon 9-11 så ut til å være de rikeste på pellitorin. Ut fra NMR-spektroskopi (vedlegg E, side 154) så subfraksjon 6 fra sammenslått fraksjon 9 og 10 ut til å bestå av ganske rent pellitorin.



Figur 7. Pellitorin

Tabell 15. Pellitorin ^1H NMR-data.

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
7,20ppm	(1 H, dd, J 10,0; 15,0)	H-3
6,17ppm	(3H, m)	H-4, H-5, NH

5,87ppm	(1 H, d, J 15,1)	H-2
5,58ppm	(1 H, br s)	NH
3,18ppm	(2H, dd, J 6,0; 6,9)	H-1'
1,82ppm	(1 H, m)	H-2'
1,44ppm	(2H, m)	H-7
1,32ppm	(4H, m)	H-8, H-9
0,91ppm	(6H, d, J 6,7)	H-3', H-4
0,88ppm	(3H, t, J 7,0)	H-10

Tabell 16. Pellitorin ^{13}C (APT) NMR-data

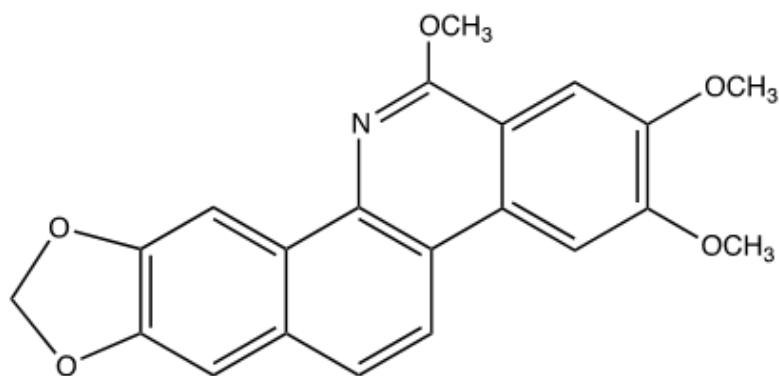
Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
166,6ppm	C	C=O
143,1ppm	CH	C-5
141,2ppm	CH	C-3
128,3ppm	CH	C-4
121,9ppm	CH	C-2
47,0ppm	CH ₂	C-1
32,9ppm	CH ₂	C-6
31,4ppm	CH ₂	C-8
28,6ppm	CH	C-2
22,5ppm	CH ₂	C-9
20,2ppm	CH ₃	C-3, C-4

14,0ppm	CH ₃	C-10
---------	-----------------	------

Pellitorin ble identifisert ut fra sammenligning av NMR-spektra med tidligere isolert stoff fra *Z. heitzii* [55] og litteraturdata [59].

Rhoifolin B

I subfraksjon 7 fra fraksjon 14 ble det observert signaler i NMR som kunne tyde på at ikke identifiserte alkaloider var til stede. Denne subfraksjonen ble renset videre på kromatotron. Fraksjon 2 fra kromatotronen ble identifisert som rhoifolin B ut fra spektra (vedlegg H, side 159) og sammenligning med litteraturdata [60, 61].



Figur 7. Rhoifolin B

Tabell 17. Rhoifolin B ¹H NMR-data

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
8,00ppm	(1 H, d, J 8,7)	H-11

7,93ppm	(1 H, s)	H-7
7,65ppm	(1 H, s)	H-4
7,60ppm	(1 H, s)	H-10
7,57ppm	(1 H, d, J 8,6)	H-12
7,19ppm	(1 H, s)	H-1
6,11ppm	(2H, s)	OCH ₂ O
4,11ppm	(3H,s)	OCH ₃
4,06ppm	(3H,s)	OCH ₃
3,99ppm	(3H,s)	OCH ₃

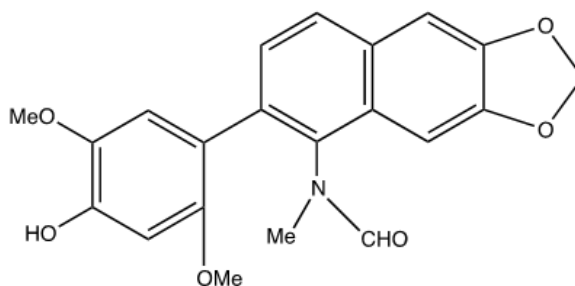
Tabell18. Rhoifolin B ¹³C (APT) NMR-data

Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
153,5ppm	C	C-9
149,7ppm	C	C-7
135,8ppm	C	C-4 β
131,8ppm	C	C-12 α
128,9ppm	C	C-10 α
123,2ppm	CH	C-12
121,0ppm	C	C-4 α
118,4ppm	C	C-6 α
118,3ppm	CH	C-11

116,7ppm	C	C-10 β
108,6ppm	CH	C-7
104,8ppm	CH	C-1
102,8ppm	CH	C-10
102,6ppm	CH	C-4
101,5ppm	CH ₂	OCH ₂ O
56,1ppm	CH ₃	OCH ₃
55,8ppm	CH ₃	OCH ₃
41,2ppm	CH ₃	OCH ₃ -6

Multiplisitet er bestemt ut fra APT-spektret og sammenligning med litteraturdata, posisjon i molekylet fra sammenligning med litteraturdata [60, 61].

Turraeanthin A



Figur 9. Turraeanthin A.

Fraksjon 4 fra ovennevnte kromatotronseparering hadde følgende ¹H NMR-spektrum (vedlegg I, side 153-154).

Tabell19. Turraeanthin A ^{13}C (APT) NMR-data

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
8,32 ppm	("0,75H", s)	CHO (majorrotamer)
8,15ppm	("0,25H", s)	CHO (minorrotamer)
7,75 ppm	(1 H, d, J 8,4cps)	H-12
7,22 ppm	("0,22H", s)	H-1 (minorrotamer)
7,21 ppm	("0,78H", s)	H-1 (majorrotamer)
7,08 ppm	("0,28H", s)	H-4 (minorrotamer)?
6,98 ppm	("0,72H", s)	H-4 (majorrotamer)?
6,63 ppm	(1 H, s)	H-7
6,59 ppm	(s)	H-10 (majorrotamer)
6,54 ppm	(s)	H-10 (minorrotamer)
6,08 ppm	("1,3H", d, J 9,5cps)	OCH ₂ O (majorrotamer)
6,07 ppm	("0,7H", d, J 9,5cps)	OCH ₂ O (minorrotamer)
3,90 ppm	("2,2H", s)	OCH ₃ (majorrotamer)
3,86 ppm	("0,8H", s)	OCH ₃ (minorrotamer)
3,80 ppm	(?, s)	OCH ₃ (majorrotamer)
3,80 ppm	(?, s)	OCH ₃ (minorrotamer)

Dublett (fra H-11) som kobler med signal ved 7,75 ppm kan være skjult av kloroformsignal.

Integral for signaler fra rotamerene fra H-10 ved 6,54 /6,59 ppm stemmer dårlig, så

integralforhold er ikke angitt i tabellen. Signalene ved 3,80 ppm ligger så nær hverandre at integralforholdet mellom dem ikke kan bestemmes.

Tidligere publiserte spektra [62, 63] er tatt opp i andre løsemidler, og stemmer derfor ikke helt med våre spektre. Det ser ut som stoffet vårt består av to former, en hovedform og en minorform. Dette kan være rotamere. Vardamides et al og Talontsi et al har ikke rapportert om slike rotamere, men et tilsvarende tilfelle med hindret rotasjon om binding til et formyl- og metylsubstituert N er nylig rapportert [64].

På grunn av lite stoff er signalene i APT spektret svake.

Tabell 20. Turraeanthin A ^{13}C (APT) NMR-data

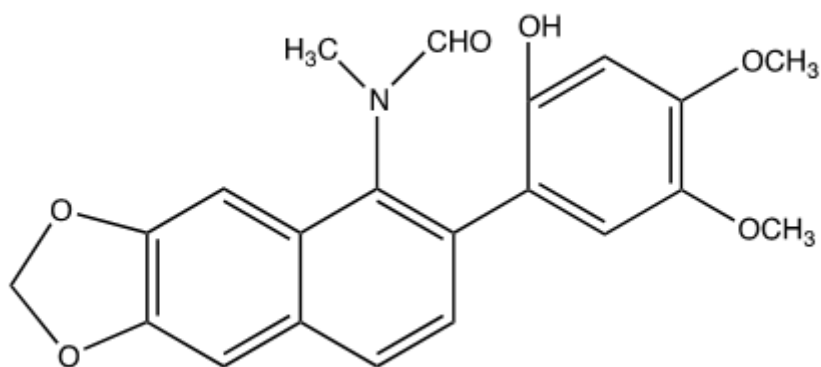
Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
162,6 ppm	C	CHO
144,5 ppm	C	?
133,7 ppm	C	C-13
128,0 ppm	CH	C-12
127,0 ppm	CH	C-11
120,1 ppm	C	?
115,9 ppm	C	C-10 α
113,4 ppm	CH	C-7
104,3 ppm	CH	C-1
101,4 ppm	CH ₂	OCH ₂ O
100,7 ppm	CH	C-10
99,1 ppm	CH	C-4

56,7 ppm	CH ₃	OCH ₃
55,9 ppm	CH ₃	OCH ₃
33,1 ppm	CH ₃	NCH ₃

Disse signalene stemmer ganske godt med litteratordata [62, 63], selv om noen av signalene ikke ses på grunn av mye støy.

Isoarnottianamid

Kromatotronfraksjon 7 fra separeringen nevnt over ble ut fra NMR-data (vedlegg F, side 155-156) og sammenligning med data for turraeanthin A (se over) identifisert som isoarnottianamid. I litteraturen er det bare funnet NMR-spektra i CF₃COOH eller DMSO-d₆, så sammenligning blir noe usikker.



Figur 9. Isoarnottianamid

Tabell 21. Isoarnottianamid ^1H NMR spektrum.

Kjemisk skift	Integral, multiplisitet, koblingskonstant	Posisjon i molekylet
8,30 ppm	($^0,14\text{H}$, s)	CHO (majorrotamer)
8,17 ppm	($^0,86\text{H}$, s)	CHO (minorrotamer)
7,73 ppm	(1 H, d, J 8,3)	H-11
7,32 ppm	(1 H, d, J 8,4)	H-12
7,20 ppm	($^0,13\text{H}$, s)	H-1, minorrotamer
7,18 ppm	($^0,87\text{H}$, s)	H-1, majorrotamer
7,04 ppm	(1 H, s)	H-4?
6,62 ppm	($^0,85\text{H}$, s)	H-7, majorrotamer
6,62 ppm	($^0,15\text{H}$, s)	H-7, minorrotamer
6,56 ppm	(1 H, s)	H-10
6,07 ppm	(2H, m)	OCH ₂ O
3,89 ppm	($^0,4\text{H}$, s)	OCH ₃ (minorrotamer)
3,81 ppm	($^2,6\text{H}$, s)	OCH ₃ (majorrotamer)
3,80 ppm	(3H, s)	OCH ₃

Tabell 22. Isoarnottianamid ^{13}C (APT) NMR spektrum.

Skiftposisjon	Multiplisitet	Posisjon i molekylet
173,9 ppm	C	CHO
149,9 ppm	C	?
142,5 ppm	C	?
131,2 ppm	C	C-13
128,0 ppm	CH	C-12
127,4 ppm	CH	C-11
115,9 ppm	C	C-10 α
113,8 ppm	CH	C-7
104,4 ppm	CH	C-1
101,5 ppm	CH ₂	OCH ₂ O
100,8 ppm	CH	C-10
99,0 ppm	CH	C-4
56,7 ppm	CH ₃	OCH ₃
55,7 ppm	CH ₃	OCH ₃
33,0 ppm	CH ₃	NCH ₃

Tilordningene er usikre. Det er dårlig signal/støyforhold, og mange signaler fra kvaternære karbonatomer er skjult av støy. Det foreligger ikke litteraturdata i samme løsemiddel som vi har brukt.

5.1.1 Analytisk og preparativ HPLC

Karakteristiske topper i NMR spektrene ble brukt som grunnlag for å velge ut fraksjoner til å analysere ved HPLC. De karakteristiske signalene gjelder spesielt aromatiske metoksylder ved ca 3,8-4,1 ppm, N-metylprotoner ved ca 2,5-3,2 ppm og aldehydprotoner ved ca 8-8,5 ppm. På bakgrunn av resultater fra analytisk HPLC ble det fokusert på å rense videre på de fraksjonene som så ut til å inneholde tilstrekkelige mengder av alkaloider for videre opprensing. I kromatogrammet for flere av fraksjonene ble det observert signaler med absorpsjonsmaksimum ved 237 nm, 291 nm og 330 nm, noe som er karakteristisk for alkaloider av arnottianamid-type [62]. Fraksjoner som ble renset opp med preparativ HPLC og hvilke stoffer som ble identifisert er vist i Tabell 23-25.

Signalene ved 8,32 og 8,16 ppm i NMR-spekteret stammer fra -NCHO (aldehydprotonet) i henholdsvis turraeanthin A major og minor. Turraeanthin A ser ut til å forekomme i en likevekt mellom minor og major rotamer, og det er forskjeller i kjemisk skiftverdi for protoner som befinner seg i nærheten av nitrogenatomet for de to rotamere formene. Integralene for disse to signalene viser omtrent et 3:1 forhold.

De tre fraksjonene V6-7V9K4-5, V3V9-10 og V14V8K3+V14V7K4-5 så alle ut til å inneholde disse rotamere formene. Eksempelvis er det i kromatogrammet for analytisk HPLC av fraksjon V3V9-10 observert to like signaler som befinner seg tett inntil hverandre. Absorpsjonstoppene i kromatogrammet for disse to kan sees etter ca. 7-8 minutter ved bølgelengdene 237 nm, 291 nm og 330 nm. De to rotamere formene ble identifisert i fraksjon V3V9-10H1 (minor) og V3V9-10H4 (major). Det gjenstår ytterligere NMR-karakterisering av de to rotamerene for å si dette med sikkerhet da fenomenet tidligere ikke rapportert for ringåpnende alkaloider som turraeanthin A og isoarnottianamid.

Rhoifolin B ble funnet i både fraksjon V6-7V9K4-5 og V3V9-10. Da stoffet er mest upolart sammenlignet med turraeanthin A, binder det seg i større grad til C18 kolonnen og kommer ut på slutten av HPLC-kjøringen. Dens absorpsjonstopp kan observeres i kromatogrammet etter ca. 11 minutter, se kromatogram, vedlegg 9.4.1 og 9.4.2, side 155-156.

Dessverre var de fleste fraksjonene etter preparativ HPLC ganske små (under 10 mg), og en del stoff gikk tapt underveis i kromatograferingen. Tap av stoff kan skyldes at det ble sittende fast i kolonnen, eller degradering av komponenter.

Tabell 23. Identifikasjon av stoffer fra preparativ HPLC av fraksjon V6-7V9K4-5. Alle fraksjonene veide 1 mg eller mindre.

Fraksjon	Identifikasjon
v6-7v9c4H1	-
v6-7v9c4H2	-
v6-7v9c4H3	-
v6-7v9c4H4	-
v6-7v9c4H5	<p>NMR:</p> <p>svake signaler</p> <p>N-CHO: 8.15</p> <p>OMe: 3.89, 3.80</p> <p>N-Me: 3.02</p> <p>Turraeanthin A-major rotamer</p>
v6-7v9c4H6	<p>NMR:</p> <p>N-CHO: 8.15</p> <p>OMe: 3.88, 3.80</p> <p>N-Me: 3.02</p> <p>Turraeanthin A-major rotamer</p>
v6-7v9c4H7	<p>NMR: svake signaler</p> <p>OMe: 3.89, 3.80</p>

	N-Me: 3.02 Turraeanthin A-major rotamer.
v6-7v9c4H8	NMR: N-CHO: 8.08 OMe: 3.88 N-Me: 3.16 Ukjent
v6-7v9c4H9	
v6-7v9c4H10	
v6-7v9c4H11	NMR: OMe: 4.00, 4.06, 4.11 Rhoifoline B

Tabell 24. Identifikasjon av stoffer fra preparativ HPLC av fraksjon v3v9-10.

Fraksjoner	Identifikasjon
V3V9-10H0	
V3V9-10H1 < 1 mg	NMR N-CHO: 8.32. OMe: 3.89, 3.80. N-Me: 3.12.

	Turraeanthin A-minor rotamer
v3v9-10 H2 <1mg	<p>NMR</p> <p>N-CHO: 8.08, 8.37</p> <p>OMe: 3.88</p> <p>N-Me: 3.16</p> <p>Ukjent</p>
v3v9-10 H3 2.9 mg	<p>NMR:</p> <p>N-CHO: 8.16</p> <p>OMe: 3.80, 3.86</p> <p>N-Me: 3.01</p> <p>Turraeanthin A-major rotamer</p>
v3v9-10H4 1.9 mg	<p>NMR:</p> <p>N-CHO: 8.07.</p> <p>OMe: 3.88</p> <p>N-Me: 3.16</p> <p>Ukjent</p>
v3v9-10H5 Lite stoff	
v3v9-10H6 Lite stoff	
v3v9-10H7 <1 mg	<p>NMR:</p> <p>OMe: 4.00, 4.06, 4.11</p> <p>Rhoifoline B</p>

Tabell 25. Identifikasjon av stoffer fra preparativ HPLC av fraksjon v14v8c3+v14v7c4-5. Alle fraksjonene veide 1 mg eller mindre.

Fraksjoner	Identifikasjon
v14v8c3+v14v7c4-5H1	-
v14v8c3+v14v7c4-5H2	-
v14v8c3+v14v7c4-5H3	-
v14v8c3+v14v7c4-5H4	-
v14v8c3+v14v7c4-5H5	NMR: Turraeanthin A major og minor i blanding
v14v8c3+v14v7c4-5H6	-
v14v8c3+v14v7c4-5H7	-
v14v8c3+v14v7c4-5H8	NMR: N-CHO: 8.16 OMe: 3.80, 3.87 N-Me: 3.01 Turraeanthin A-major rotamer
v14v8c3+v14v7c4-5H9	NMR: N-CHO: 8.16 OMe: 3.80, 3.87 N-Me: 3.01

	Turraeanthin A-major rotamer
v14v8c3+v14v7c4-5H10	NMR: Uren, terpener?
v14v8c3+v14v7c4-5H11	NMR: Uren, terpener?
v14v8c3+v14v7c4-5H12	NMR: Uren
v14v8c3+v14v7c4-5H13	Tom

5.2 Biologiske studier

5.2.1 Toksisitet på rekellarver (Brine shrimp lethality essay)

I det kommende avsnittet vises og forklares resultater fra toksisitetstester på rekellarver.

Renstoffer og ulike rækstrakter tilgjengelig fra tidligere forsøk ble testet her.

Etylacetatekstraktet og etanolekstraktet av barken, samt noen andre rækstrakter fra blad og frø tilgjengelige fra tidligere forsøk ([55], Mikolo et al, upubliserte resultater), ble også undersøkt.

Toksisitet på rekellarver av rækstrakter

Tabell 26. Toksisitet av forskjellige ekstrakter av ulike plantedeler av *Z. heitzii* og av positiv kontroll (podofyllotoksin). For positiv kontroll er bare en konsentrasjon målt.

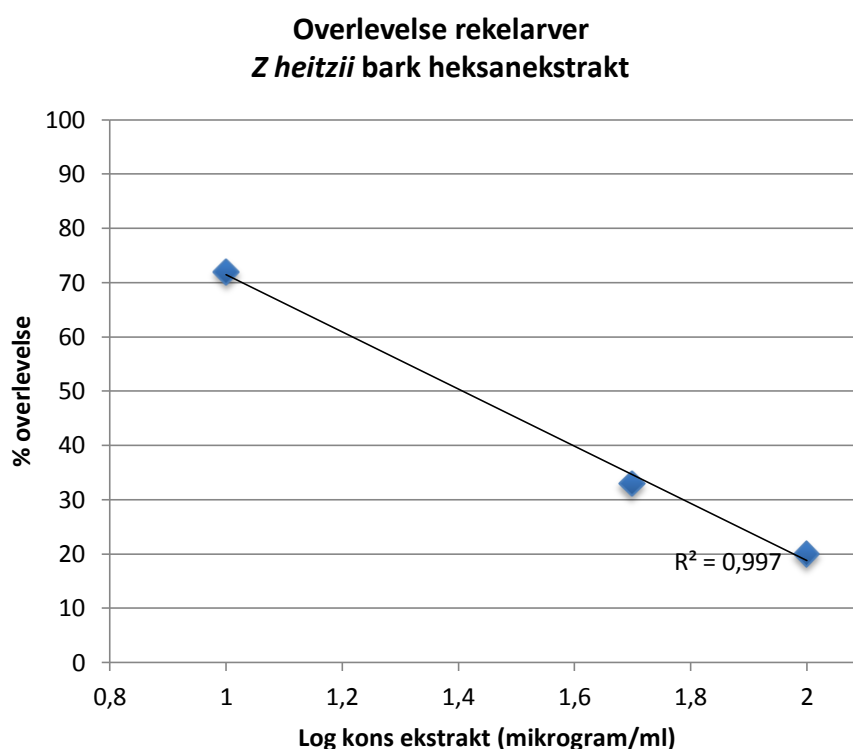
Bark heksanekstrakt				Bark EtOAc-ekstrakt				Bark EtOH-ekstrakt			
Kons.	Log	% over-	SD	Kons.	Log	% over-	SD	Kons.	Log	% over-	SD
$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse		$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse		$\mu\text{g/ml}$	kons.	Levelse	
100	2,00	20	8	100	2,00	93	5	100	2,00	87	18
50	1,70	33	3	50	1,70	90	11	50	1,70	70	13
10	1,00	72	24	10	1,00	93	9	10	1,00	87	33

Blad heksanekstrakt				Blad EtOAc-ekstrakt				Blad EtOH-ekstrakt			
Kons.	Log	% over-	SD	Kons.	Log	% over-	SD	Kons.	Log	% over-	SD
$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse		$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse		$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse	
100	2,00	83	9	100	2,00	76	8	100	2,00	94	4
50	1,70	100	12	50	1,70	91	9	50	1,70	96	6
10	1,00	93	4	10	1,00	44	10	10	1,00	90	14

Frø heksanekstrakt				Podofyllotoksin (pos.kontroll)			
Kons.	Log	% over-	SD	Kons.	Log	% over-	SD
$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse		$\mu\text{g/ml}$	kons.	levelse	
100	2,00	37	16				
50	1,70	69	2	50	1,70	22	17
10	1,00	37	15				

Heksan barkekstrakt

Heksanekstraktet av *Z. heitzii* bark viste en tydelig toksisitet på rekellarver. Effekten var konsentrasjonsavhengig, og LD₅₀ ble bestemt til 24 ± 10 mikrogram/ml. For lineær regresjon av overlevelse som funksjon av log-konsentrasjon ble korrelasjonskoeffisienten (R^2) utregnet til å være 0,997. Alle de andre ekstraktene var mindre aktive (LD₅₀ > 50 µg/mL.) Den høyest målte konsentrasjonen var 100 µg/ml.



Figur 11. Toksisitet på rekellarver av *Z. heitzii* heksan barkekstrakt (vist som % overlevelse)

Etylacetat barkekstrakt

En svak toksisk effekt som ikke var konsentrasjonsavhengig ble observert. Korrelasjonen (R^2) mellom konsentrasjon og overlevelse var 0,050.

Etanol barkekstrakt

Her ble det observert en svak toksisk effekt som ikke ser ut til å endre seg ved økende konsentrasjoner av ekstraktet. Korrelasjonen (R^2) mellom konsentrasjon og overlevelse var 0,050.

Heksan bladekstrakt

Her ble det observert en svak toksisk effekt og liten nedgang i overlevelse ved økende konsentrasjoner av ekstraktet. Her ses en svak korrelasjon (R^2) utregnet til å være 0,152.

Etylacetat bladekstrakt

Den høye dødeligheten ved laveste konsentrasjon av testsubstans kan bero på feil under forsøket. Siden dødeligheten ved den høyeste konsentrasjonen er lav og toksisiteten synes å ikke være konsentrasjonsavhengig, antas det at dette ekstraktet er lite toksisk.

Etanol bladekstrakt

Dette ekstraktet er lite toksisk ved alle konsentrasjoner (overlevelse 90% eller høyere). Det synes ikke å være noen tydelig konsentrasjon-toksitet sammenheng.

Heksan frøekstrakt

Dette ekstraktet kan ha en viss toksitet, men det er ikke noen klar konsentrasjon-toksitet sammenheng. Det kan være ønskelig å teste dette ekstraktet igjen.

Oppsummert

Kort beskrevet viste ingen av følgende ekstrakter noen konsentrasjonsavhengig dødelighet: etylacetatekstrakt og etanolekstrakt av bark, heksanekstrakt, etylacetat og etanolekstrakt av blad, heksanekstrakt av frø. Disse ekstraktene ga 70 % overlevelse eller mer ved høyeste testede konsentrasjon, 100 µg/ml. Pellitorin var det eneste stoffet med høy aktivitet.

Toksisitet på rekellarver av renstoffer fra heksan barkekstraktet Caryofyllenoksid

Tabell 27. Toksisitet av renstoffer fra *Z. heitzii* og av positiv kontroll (podofyllotoksin). For positiv kontroll er bare en konsentrasjon målt. Pellitorin er målt ved andre konsentrasjoner enn de andre stoffene.

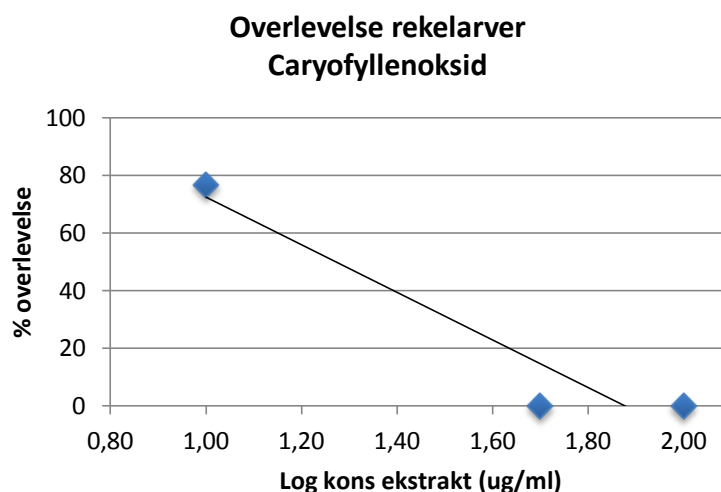
Dihydronitidin				Pellitorin				Sesamin			
Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD	Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD	Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD
100	2,00	97	5	50	2,00	0	0	100	2,00	47	9
50	1,70	97	4	10	1,70	0	0	50	1,70	53	17
10	1,00	100	0	1	1,00	94	8	10	1,00	69	7

Caryofyllenoksid				Isobauerenol				Isoarnottianamid			
Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD	Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD	Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD
100	2,00	0	0	100	2,00	93	5	100	2,00	90	8
50	1,70	0	0	50	1,70	100	0	50	1,70	100	0
10	1,00	77	21	10	1,00	100	0	10	1,00	100	0

Podofyllotoksin (pos.kontroll)			
Kons. µg/ml	Log kons.	% over- levelse	SD
50	1,70	23	5

Caryofyllenoksid

Caryofyllenoksid virket toksisk på rekellarver (*Artemia salina*). Ved konsentrasjoner på 100 og 50 µg/ml døde samtlige larver, ved 10 µg/ml overlevde 77 %. Konsentrasjonen som gir 50 % dødelighet, LD₅₀, ser derfor ut til å ligge mellom 10 og 50 µg/ml.



Figur 12. Toksisitet av caryofyllenoksid på rekellarver (vist som % overlevelse).

Dihydronitidin

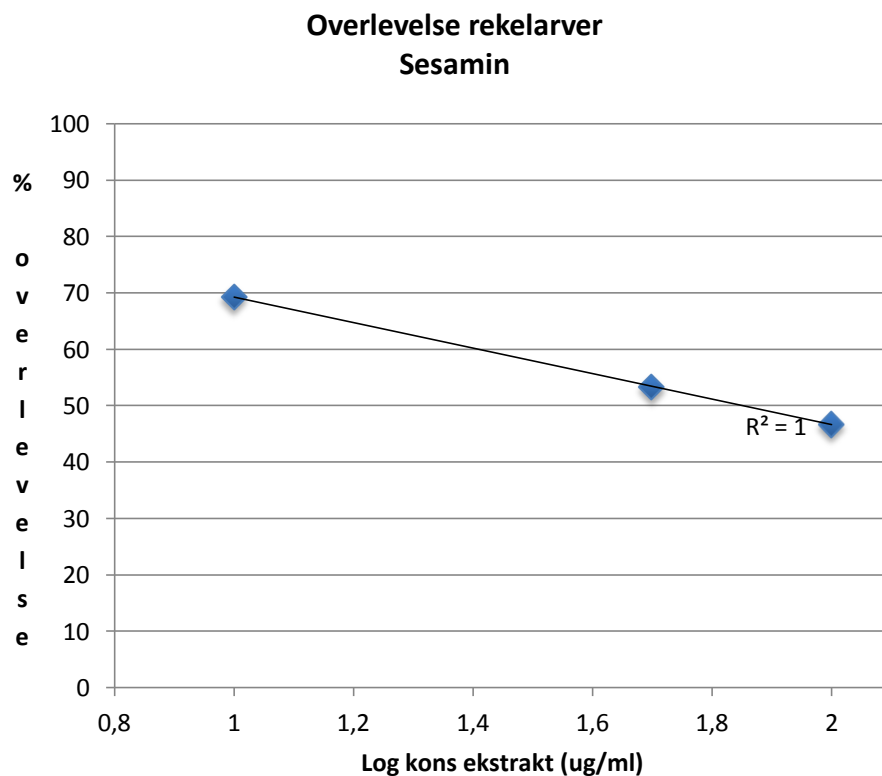
Resultatene tyder på at dihydronitidin ikke er toksisk for rekellarver (97 ± 5 % overlevelse ved høyeste målte konsentrasjon, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Isobauerenol

Isobauerenol var ikke toksisk for rekellarver (93 ± 5 % overlevelse ved høyeste målte konsentrasjon, 100 $\mu\text{g/ml}$).

Sesamin

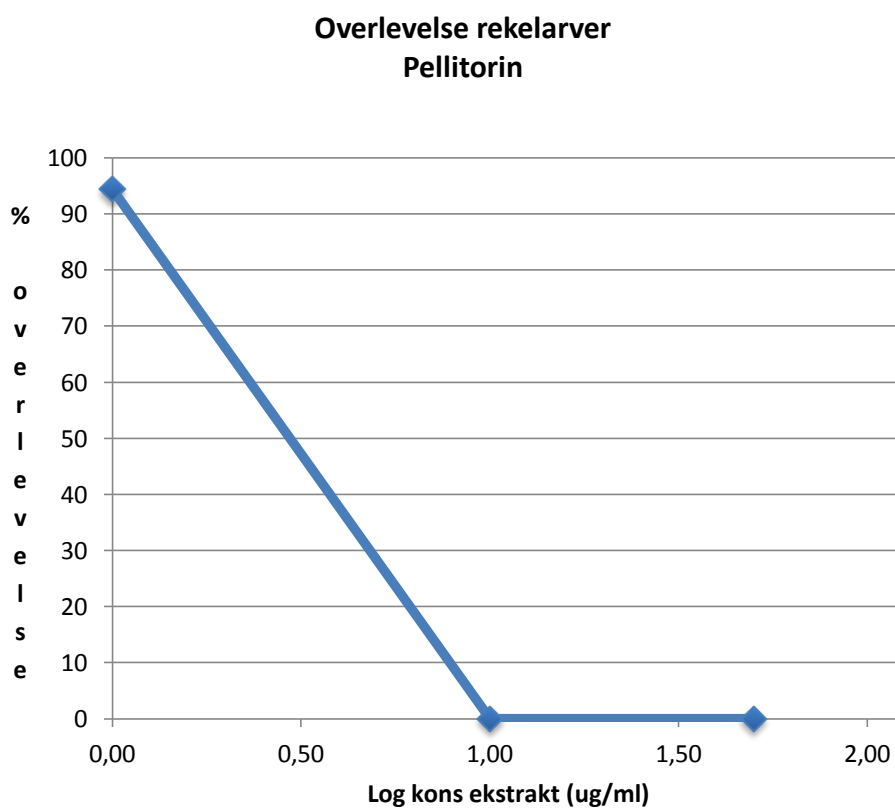
Sesamin viste en moderat, men konsentrasjonsavhengig toksisitet på rekellarver. Ved høyeste testede konsentrasjon var dødeligheten 53 %. Det er en lineær korrelasjon (R^2 utregnet til å være 0,9996) mellom log konsentrasjon og dødelighet. $\text{LD}_{50} = 71 \pm 34 \mu\text{g/ml}$.



Figur 13. Toksisitet av sesamin på rekellarver (vist som % overlevelse).

Pellitorin

Pellitorin var sterkt toksisk for rekellarver. Ved en konsentrasjon på 10 mikrogram/ml døde samtlige larver, ved 1 µg /ml overlevde 94 ± 8 %. LD_{50} ligger ut fra dette på mellom 1 og 10 mikrogram/ml. Det må nevnes at ved laveste benyttede konsentrasjon à 1 µg/ml var rekellarvene trolig i ferd med å dø – noe som ikke kommer frem ved bruk av denne testmetoden. Med de funnede verdiene kan ikke korrelasjonskoeffisienten regnes ut.



Figur 14. Toksisitet av pellitorin på rekellarver (vist som % overlevelse).

Isoarnottianamid

Isoarnottianamid var ikke toksisk for rekellarver (10 ± 8 % dødelighet ved høyeste målte konsentrasjon, 100 µg/ml).

Rhoifolin B

Rhoifolin B var ikke tilgjengelige i store nok mengder for testing.

Turraeanthin A

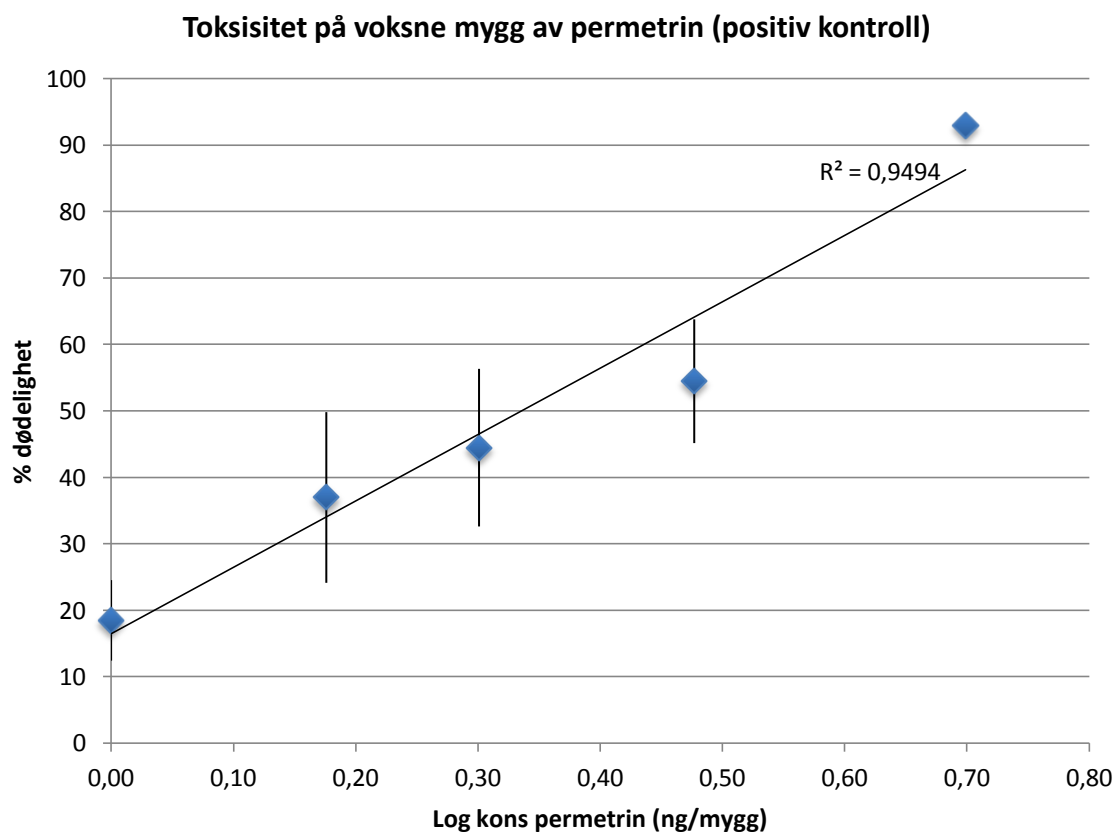
Turraeanthin A var ikke tilgjengelige i store nok mengder for testing.

5.3 Toksisitet på voksne hunmygg, *Anopheles gambiae*

5.3.1 Topikal myggtest

Permetrin og aceton

Permetrin ble brukt som positiv kontroll. I vårt forsøk hadde permetrin en LD₅₀-verdi på 2,4 ±1,0 ng/mygg. Negativ kontroll (aceton) var ikke toksisk.



Figur 15. Dødelighet av permetrin på *A.gambiae* hunnmygg.

Caryofyllenoksid

Caryofyllenoksid ble vist i to separate forsøk å ha være ikke-toksisk på hunner av *A. gambiae*, selv ved høye konsentrasjoner. Ved applikasjon av en mengde på 100 ng/mygg var dødeligheten 6 ± 6 % mot 3 ± 3 % for negativ kontroll. Ved 1000 ng per mygg døde kun 0 % i det ene forsøket, 12 % i det andre.

Dihydranitidin

Dihydranitidin var ikke toksisk for voksne *A. gambiae* hunnmygg. Ved applikasjon av en mengde på 100 nanogram/mygg var dødeligheten 6 ± 3 % mot 5 ± 3 % for negativ kontroll. Ved 1000 ng/mygg døde 25 % av hunnmyggene (gjennomsnitt av to paralleller på 21 og 29 %).

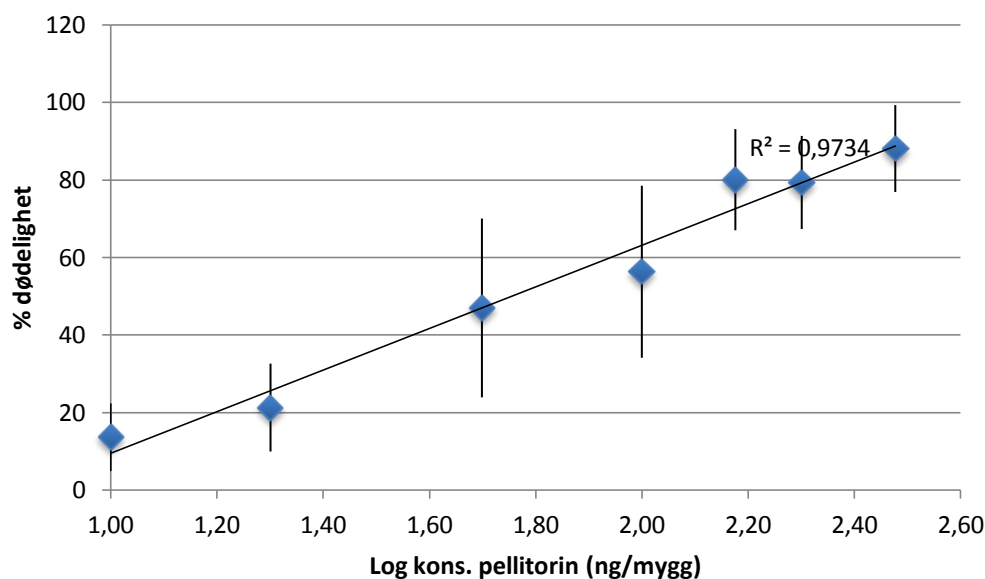
Sesamin

Dette renstoffet viste seg å være lite aktivt ved direkte kontakt med mygg. Ved en konsentrasjon på 100 nanogram/mygg var dødeligheten 10 ± 2 % mot 4 ± 3 % for negativ kontroll. Kun 16 % av hunnmyggene døde ved applikasjon av en mengde på 1000 ng/mygg (gjennomsnitt av to paralleller på 8 og 24 %).

Pellitorin

Av de renstoffene som ble testet, var pellitorin det eneste som hadde en toksisk effekt på myggene. En markant økning i antall døde mygg ble observert ved økt konsentrasjon av pellitorin. Ut fra resultater i 9 separate forsøk ble det bestemt en LD50 verdi på 68 ± 38 ng/mygg. Toksisiteten var tydelig konsentrasjonsavhengig. Ved lineær regresjon av overlevelse som funksjon av log konsentrasjon ble korrelasjonskoeffisienten (R^2) utregnet til å være 0,967. Ved den høyeste konsentrasjonen, 300 ng/mygg, ble det observert en dødelighet på 88 ± 11 %.

Dødelighet på voksne *A. gambiae* hunnmygg av pellitorin

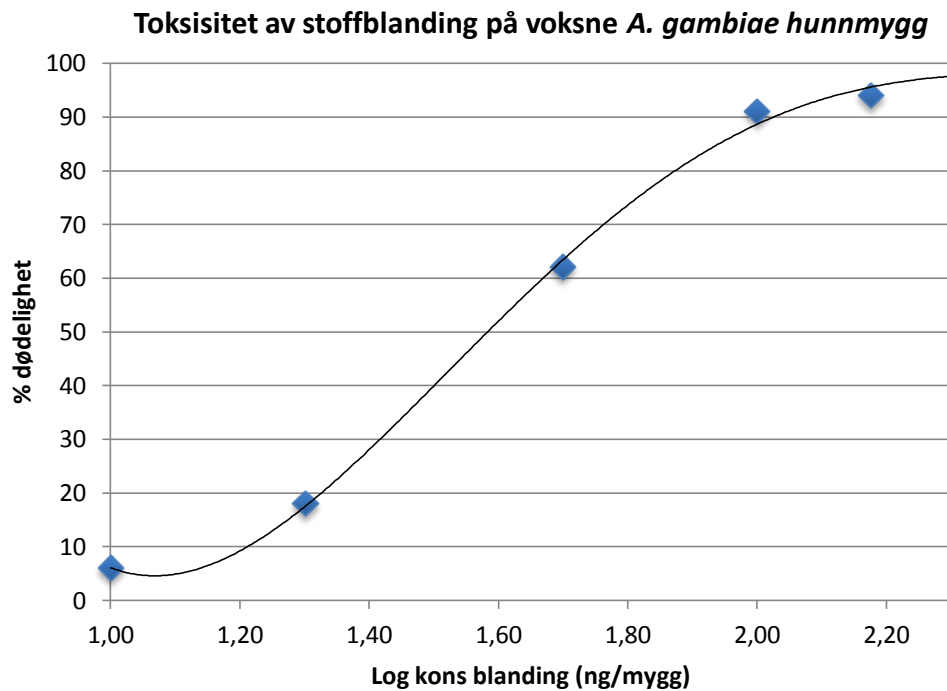


Figur 16. Toksisitet av pellitorin på voksne hunner av *A. gambiae*. R^2 verdi er vist for lineærregresjon.

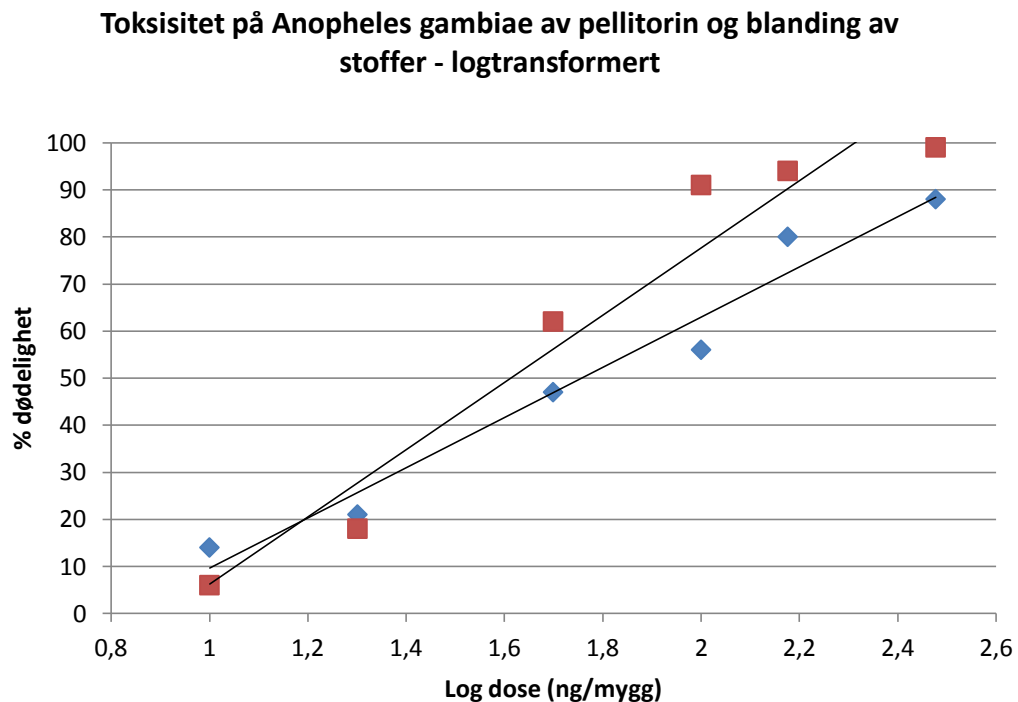
Blanding av renstoffer

(4 % caryofyllenoksid, 31 % dihydronitidin, 26 % sesamin og 39 % pellitorin, et mengdeforhold som omtrent tilsvarte det som var i ekstraktet)

Når caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin ble blandet i et mengdeforhold som omtrent tilsvarte det som var i ekstraktet (4:31:26:39), var blandingen toksisk for *A. gambiae* hunnmygg med en LD_{50} verdi på 39 ± 14 ng/mygg. Applikasjon av denne blandingen renstoffer viste en tydelig konsentrasjonsavhengig dødelighet hos hunnmyggen. Her ble det observert en markant nedgang i antall overlevende hunnmygg ved økende konsentrasjoner av testløsningen. For lineær regresjon av overlevelse som funksjon av log konsentrasjon ble korrelasjonskoeffisienten (R^2) utregnet til å være 0,942. En dødelighet på 99 ± 2 % ble observert ved tilsetning av en mengde på 99 ng per mygg. LD_{50} ble beregnet til 39 ± 14 ng/mygg.



Figur 17. Toksisitet av blanding av caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin på voksne hunner av *A. gambiae*. Kurvetilpasning som 4. ordens polynom.



Figur 18. Øvre kurve (linearitet: $R^2 = 0.9418$) er for blanding av caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin, nedre kurve (linearitet: $R^2 = 0.9672$) er for pellitorin alene. Både blanding og pellitorin dreper hunnmygg, men blandingen av renstoffer har en høyere aktivitet

Tabell 28. Pellitorin og blanding (4 % caryofyllenoksid, 31 % dihydronitidin, 26 % sesamin, 39 % og pellitorin) viser aktivitet og dreper *Anopheles gambiae*-hunnmygg.

Mengde (ng/mygg)	300	200	150	100	50	20	10	0 negativ kontroll	LD ₅₀
Dødelighet (%)									
Pellitorin	88±11	79±12	80±13	56±22	47±23	21±11	14±9	6±7	68±38
Blanding	99±2	94±8	91±8	91±7	62±15	18±11	6±6	6±6	39±14

5.3.2 Toksisitet på larver av *Anopheles gambiae*

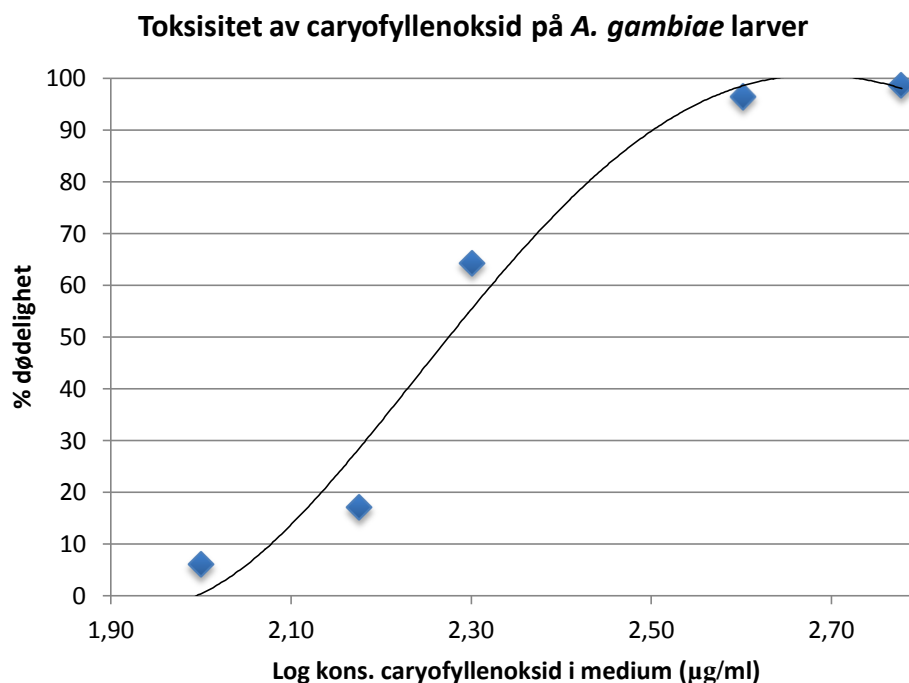
Mygglarvetest

Etanol

Etanol ble brukt som negativ kontroll og viste ingen toksisitet på mygglarvene.

Caryofyllenoksid

Caryofyllenoksid ble testet på larver av *A. gambiae* i fire separate forsøksserier. Alle forsøkene viste at caryofyllenoksid var toksisk, og at virkningen var konsentrasjonsavhengig. En dødelighet på 99 ± 2 % ble observert ved konsentrasjonen 400 $\mu\text{g/ml}$. Gjennomsnittlig LD_{50} verdi ble bestemt til 174 ± 33 mikrogram/ml.



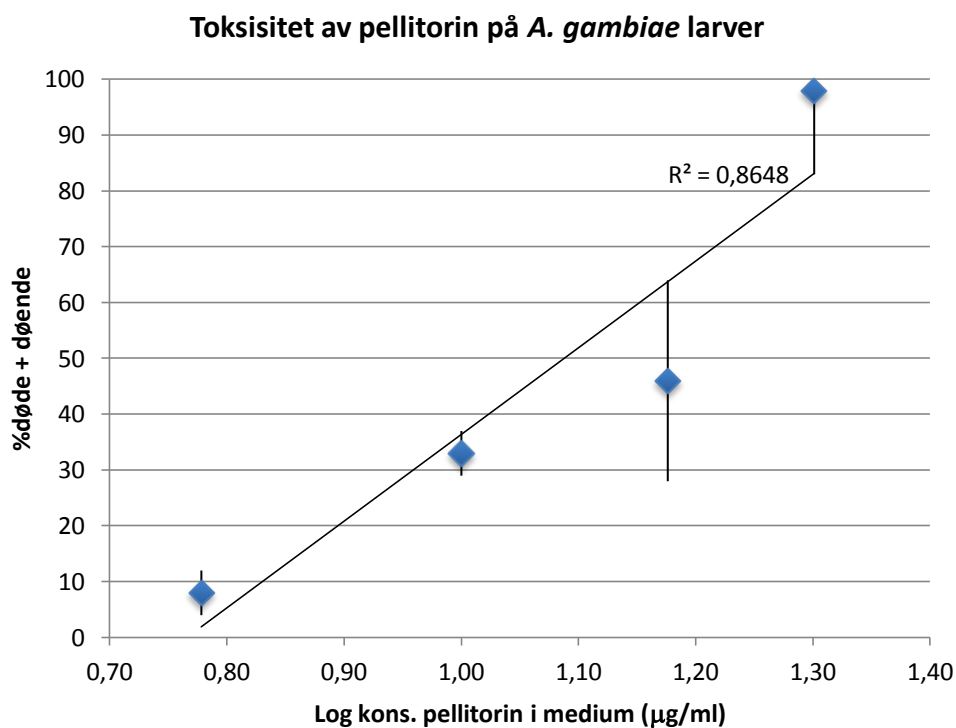
Figur 19. Larvicid effekt av caryofyllenoksid. Kurvetilpasning som 4. ordens polynom.

Sesamin

Sesamin var lite toksisk for mygglarver, med en dødelighet ved 100 mikrogram/ml på 14 ± 4 %. Ved konsentrasjonen 150 $\mu\text{g/ml}$ ble det observert 23 ± 3 % dødelighet hos mygglarvene. LD_{50} var følgelig langt over 150 $\mu\text{g/ml}$.

Pellitorin

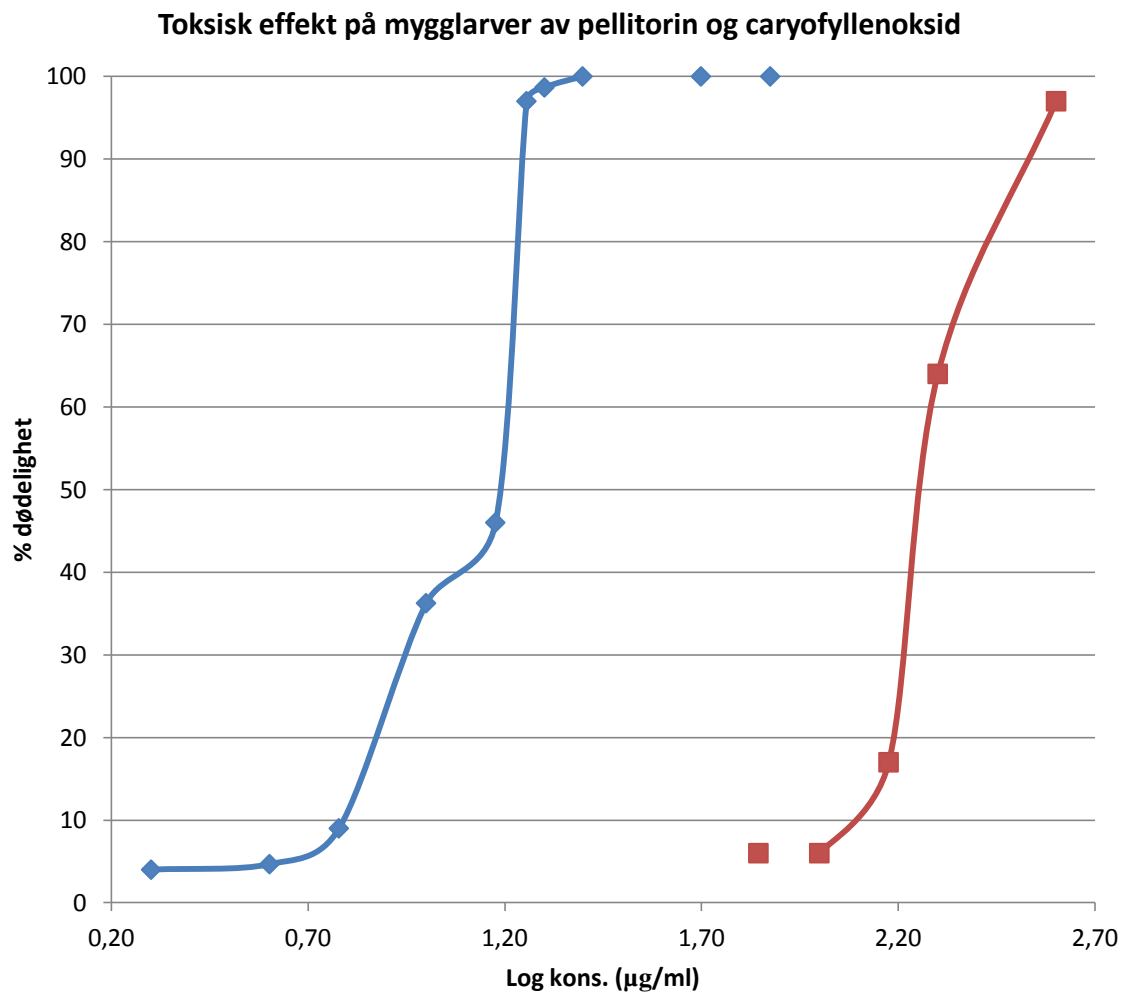
Pellitorin var toksisk for mygglarver. En markant økning i antall døde mygglarver ble observert ved økt konsentrasjon av pellitorin. Det ble observert 100 % dødelighet ved konsentrasjonen 25 µg/ml. LD₅₀ ble ut fra fire separate forsøksserier funnet til 14 ±1 mikrogram/ml.



Figur 20. Dødelighet av pellitorin for *A. gambiae* mygglarver. R² verdi er vist for lineær regresjon.

Dihydranitidin

Dihydranitidin var ikke løselig i testsystemet (etanol) som ble brukt. Det er derfor ingen data for larvicid effekt av dihydranitidin. Selv om dihydranitidin kunne løses i diklormetan, var dette løsemiddelet toksisk for larvene.



Figur 21. Pellitorin (venstre kurve) og caryofyllenoksid (høyre kurve) dreper mygglarver, men pellitorin har mye høyere aktivitet. Sesamin (ikke vist) har omtrent samme effekt som caryofyllenoksid.

6 Diskusjon

6.1 Kjemiske studier

Caryofyllenoksid

Det ser ikke ut til at caryofyllenoksid er funnet tidligere i *Zanthoxylum heitzii*. Det er imidlertid et vanlig naturstoff og er funnet i eteriske oljer fra en lang rekke andre *Zanthoxylum*-arter, f. eks. *Z. schinifolium*[65] .

Dihydronitidin

Dihydronitidin er ikke tidligere rapportert i *Z. heitzii*, men er forholdsvis vanlig i slekten *Zanthoxylum*, se for eksempel [56, 66, 67]. Utenom denne slekten er dihydronitidin nokså sjeldent [67].

Isobauerenol

Isobauerenol er et relativt sjeldent triterpen, og ser ut til å være funnet bare en gang tidligere i familien Rutaceae, som *Z. heitzii* hører til [68]. Dette er ikke rapportert fra slekten *Zanthoxylum*.

Sesamin

Lignanet sesamin er et nokså vanlig naturstoff, og det er tidligere rapportert fra *Z. heitzii* bark [10].

Pellitorin

Pellitorin er ikke svært sjeldent, det er funnet i over femti planter tidligere, bl.a. i flere *Zanthoxylum*-arter som *Z. usambarense* [69] *Z. capense* [70] og *Z. acutifolium* [71] Det har imidlertid ikke blitt rapportert tidligere fra *Z. heitzii*.

Rhoifolin B

Rhoifolin B er et svært sjeldent alkaloid, det er tidligere funnet i to *Zanthoxylum*-arter [60, 61] og i *Toddalia asiatica* [72]. Det er ikke tidligere funnet i *Z. heitzii*.

Isoarnottianamid

Alkaloidet isoarnottianamid er funnet i en rekke *Zanthoxylum*-arter, først i *Z. cuspidatum* [73]. Utenom denne slekten er det bare rapportert en gang, fra *Aralia bipinnata* [74]. Dette er ikke rapportert tidligere fra *Z. heitzii*.

Turraeanthin A

Turraeanthin A er et sjeldent naturstoff, det er først rapportert fra *Turraeanthus africanus* [62], og er siden funnet i to *Zanthoxylum*-arter [63, 75]. Dette er ikke tidligere funnet i *Z. heitzii*.

Kromatografi generelt

For alkaloidene er det ikke gjort god nok separasjon av rækstraktet da de er funnet spredt rundt i mange fraksjoner. Årsaken er trolig at mobilfasen ikke har vært optimal for separasjonen, men det kan også tenkes at kolonnen ble overbelastet. En bedre separasjon av stoffene kan muligens oppnås på kromatotron.

6.2 Biologisk aktivitet

6.2.1 Toksisitet på rekellarver

Råekstrakter

Det er tydelig at heksanekstraktet av bark er det eneste ekstraktet som har noen særlig toksisk effekt på rekellarver. Dette ekstraktet er også det eneste som er vist å ha effekt på malariamykk. Ingen tidligere undersøkelser er funnet om rekellarvetoksisitet av ekstrakter av *Z. heitzii*.

Caryofyllenoksid

Caryofyllenoksid er flere ganger tidligere undersøkt for toksisitet på rekellarver. Resultatene varierer: Gohari et al [76] fant at det ikke forelå toksisitet, mens Huang et al [77] fant toksisitet med en LD₅₀-verdi på 51,7 µg/ml. Våre resultater stemmer best med Huang et al.

Dihydranitidin

Dihydranitidin er ikke tidligere undersøkt for rekellarvetoksisitet. I våre forsøk var det ikke toksisk for rekellarver.

Isobauerenol

Isobauerenol var ikke toksisk for rekellarver. Dette stemmer med tidligere funn [68].

Sesamin

Sesamin er moderat toksisk for rekellarver (LD₅₀ 71 µg /ml). I en tidligere undersøkelse er større toksisitet rapportert (LD₅₀ 2,4 µg /ml [78]).

Pellitorin

Pellitorin var sterkt toksisk for rekellarver. Ved en konsentrasjon på 10 mikrogram/ml døde samtlige larver, ved en konsentrasjon på 1 µg /ml overlevde 94 ± 8 %, (men var trolig døende), så LD₅₀ ligger mellom 1 og 10 µg/ml. Det ser ikke ut til at toksisiteten av pellitorin på rekellarver er rapportert tidligere.

Isoarnottianamid

Isoarnottianamid var ikke toksisk for rekelarver. Ingen tidligere undersøkelser av toksisitet er funnet for dette stoffet.

På grunn av stoffmangel ble ikke **rhoifolin B** og **turraeanthin A** testet. Det ser ikke ut til at noen av disse er testet for rekelarvetoksisitet tidligere.

6.2.2 Toksisitet på voksne hunnmygg, *Anopheles gambiae*

I innledende forsøk før denne oppgaven ble det gjort testing av forskjellige råekstrakter av *Z. heitzii* på forskjellige stammer av *A. gambiae*, både ikke-resistente og resistente mot andre myggmidler ([55], Mikolo et al, upubliserte resultater). Disse forsøkene viste at heksanekstraktet av barken hadde god aktivitet mot alle de testede stammene, mens ekstrakter av frø og blader var lite aktive. Ekstrakter med andre løsemidler (etylacetat, etanol, etanol-vann 1:1, og vann) var også lite aktive. Disse resultatene var grunnlag for at det i denne oppgaven ble arbeidet med heksanekstraktet av barken.

De renstoffene som var tilgjengelige i tilstrekkelig mengde (caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin) ble forsøkt testet for toksisitet på voksne hunner av *Anopheles gambiae* og på mygglarver.

Caryofyllenoksid

Caryofyllenoksid var ikke toksisk for voksne hunnmygg av *A. gambiae*, og siden det foreligger i lav konsentrasjon, ser det ut til å være lite sannsynlig at det bidrar noe særlig til den myggdrepende effekten av råekstraktet som er påvist tidligere ([55], Mikolo et al, upubliserte resultater), selv om det kan tenkes å ha synergistisk effekt.

Det er rapportert insekticid effekt av eteriske oljer som inneholder caryofyllenoksid som en av mange komponenter [79], men det ser ikke ut til at renstoffet er undersøkt tidligere.

Dihydronitidin

I ovennevnte forsøk hadde dihydronitidin ikke toksisk effekt på voksne *A. gambiae*-hunnmygg. Ingen tidligere rapporter om effekt av dihydronitidin på *Anopheles*-mygg eller andre myggarter er funnet.

Sesamin

Ingen rapporter om virkning av sesamin på voksne *A. gambiae*-hunnmygg er funnet. I våre forsøk var sesamin tilnærmet inaktivt.

Pellitorin

Pellitorin skilte seg ut som det klart mest toksiske stoffet, med en LD₅₀ verdi for voksne hunnmygg på 68 ± 38 ng/mygg. Pellitorintoksisitet mot *A. gambiae* er ikke rapportert tidligere, men det er vist [80] at pellitorin er toksisk for voksne individer av andre myggarter som *Culex pipiens* og *Aedes aegypti*, som begge er mellomverter for organismer som kan gi alvorlige sykdommer som encefalitt, meningitt, gulfeber og denguefeber.

Blanding av caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin

Ut fra vekten og sammensetningen av fraksjonene fra rækstraktet ble det anslått et mengdeforhold mellom de fire hovedkomponentene. Tre av disse stoffene har liten eller ingen effekt som renstoffer, men blandingen er toksisk med en LD₅₀ verdi på 39 ± 14 ng/mygg. Pellitorin, som er det eneste av stoffene som viste effekt, har en LD₅₀ verdi på 68 ± 38 ng/mygg. Ved en mengde av blandingen på 39 ng er pellitorinmengden 15 ng. Ut fra regresjonslinjen for pellitorin vil denne mengden gi en dødelighet på 19 ± 10 %. Forskjellen på disse dødelighetsverdiene er ikke signifikant på 5 %-nivå, men med en p-verdi (Student's t-test) på under 10% kan det se ut som det er en trend mot signifikans. Ved ytterligere forsøk og lavere standardavvik vil det være mulig å si med større sikkerhet om det foreligger en synergistisk effekt.

6.2.3 Toksisitet på larver av *Anopheles gambiae*

Caryofyllenoksid

Caryofyllenoksid er moderat toksisk på larver av *A. gambiae* (LD₅₀ 174 ±33 mikrogram/ml). Et ekstrakt som inneholder caryofyllenoksid som en av mange komponenter er toksisk mot disse larvene [81], men rent caryofyllenoksid ser ikke ut til å være testet.

Dihydronitidin

Dihydronitidin ble ikke testet for larvicid effekt på grunn av dårlig løselighet. Det ser ikke ut til at dihydronitidin er testet for effekt på larver av *A. gambiae* eller andre *Anopheles*-arter.

Sesamin

Sesamin var ikke toksisk for myggglarver i våre forsøk. Det er ikke funnet noen tidligere rapporter om effekt av sesamin på *A. gambiae* larver.

Pellitorin

Pellitorin var den aktive komponenten i heksanekstraktet, med en LD₅₀ verdi på 14 ± 1 mikrogram/ml. Ingen publikasjoner om effekt av pellitorin på *A. gambiae* larver er funnet. Det er imidlertid rapportert at pellitorin er toksisk for larver av andre moskitoarter, *Culex pipiens pallens* og *Aedes aegypti* [80, 82].

På grunn av tidsnød ble ikke blandingen av caryofyllenoksid, dihydronitidin, sesamin og pellitorin målt i dette systemet.

6.2.4 Lokal bruk i Afrika

Toksisitetsforsøk viser interessante resultater. Dette kan indikere at det er noe hold i den lokale bruken av *Z. heitzi* i Afrika. Ytterligere studier vil være nødvendig for å bestemme de biologiske effektene hos *Z. heitzi*.

7 Forslag til videre arbeid

Det er mye annet som kan være ønskelig å gjøre som en fortsettelse på dette prosjektet:

- Isolere og identifisere flere innholdsstoffer i ekstraktene fra *Z. heitzi*.
- Teste toksisitet av renstoffer på resistente mygg.
- Teste repellenteffekt på *Anopheles gambiae*.
- Teste toksisitet på voksen mygg ved inntak av renstoffene (ikke bare topikalt) for eksempel ved at de suger fra bomullsdotten dynket i honningoppløsning inneholdende renstoffet.
- Teste ekstrakter og renstoffer på malariaprotozoen, *Plasmodium falciparum*.
- Teste på flere bioassays
- Teste de andre renstoffene dihydronitidin, isobauerenol, rhoifolin b, isoarnottianamid.
- Videre forskning på pellitorin-analoger og finne farmakofor.
- Lage syntetiske insekticider basert på pellitorin
- Kjemisk karakterisering av de rotamere formene er aktuelt.

8 Konklusjon

Hovedsubstansene i planten *Z. heitzii* er dihydronitidin, pellitorin, sesamin og caryofyllenoksid. I tillegg er isobauerenol, isoarnottianamid, rhoifolin B og turraeanthin A isolert og identifisert. Sesamin er tidligere kjent i planten mens de øvrige forbindelsene er avdekket for *Z. heitzii* for første gang. Ingen av disse isolerte forbindelsene er nye naturstoffer, men rhoifolin B og turraeanthin A er svært sjeldne.

Heksanekstraktet av bark er det eneste ekstraktet som viser tydelig toksisk effekt på rekellarver (*Artemia salina*). Dette ekstraktet er også det eneste som er vist å ha effekt på malariamygg (*Anopheles gambiae*).

Ved toksisitetsstudier på rekellarver, mygglarver og hunnmygg av allerede nevnte naturstoffer, skiller naturstoffet pellitorin seg klart ut.

Pellitorin utviser særlig sterkt toksiske egenskaper på rekellarver med LD₅₀ mellom 1 µg/ml og 10 µg/ml. Sesamin er vist å være moderat toksisk for rekellarver.

Toksikologiske forsøk av pellitorin på voksne individer av *A. gambiae* mygg viste klart toksiske effekter. Her er LD₅₀ lik 68 ± 38 ng/mygg. Caryofyllenoksid, dihydronitidin og sesamin var tilnærmet inaktive.

En løsning bestående av en blanding av de ovennevnte naturstoffene ble testet på *A. gambiae* mygg, og blandingen hadde en LD₅₀ på 39 ± 14 ng/mygg. Ved ytterligere forsøk og lavere standardavvik vil det være mulig å si med større sikkerhet om det foreligger en synergistisk effekt.

Mygglarveforsøk viser at caryofyllenoksid er moderat toksisk på larver av *A. gambiae*, mens pellitorin altså var den aktive komponenten i heksanekstraktet.

Å syntetisere pellitorin analoger kan være interessant med tanke på utvikling av mulig nytt insekticid, samt videre studier på malariaparasitten *Plasmodium*.

Det kan også tyde på at det er et visst grunnlag for rapportene om plantens bruk mot malaria topikalt.

9 Vedlegg

9.1 Kromatografi

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Råekstrakt								
Z. heitzii bark heksan råekstrakt, ca 21 g, løst i ca 100 ml diklormetan (DCM)								
Filtrert (glassinter eller Whatman no.1 papir)								
Vekt av frafiltrert ca 1,3 g								
Applisert på Versapak kolonne Si gel 110x300 mm (Supelco 97712-U)								
Eluert med:								
heksan-DCM 1:1		2,5 L						
DCM		1 L						
DCM-5%EtOAc		1 L						
DCM-10%EtOAc		0,5 L						
DCM-15%EtOAc		0,5 L						
DCM-20%EtOAc		0,5 L						
DCM-30%EtOAc		0,5 L						
DCM-40%EtOAc		0,5 L						
DCM-60%EtOAc		1 L						
DCM-80%EtOAc		0,5 L						
EtOAc		1,5 L						
acetone		1 L						
heksan		2 L						
Tatt ut fraksjoner à 1L (forløp; fr.00), 0,5L(1-19),0,3L(11),0,15L(17-26), 0,25L(27-32), 0,5L (33-37)								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM (11-28), DCM-50%EtOAc (29-37)								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(0-2)	1500	237,5	237,5	0,16	1,5 x			hydrokarboner, terpenoider
2(3-10))	4000	691,4	928,9	0,17	4,4 x			fett
3(11-14)	750	1429,8	2358,7	1,91	9,0 x			fett, dihydronitidin
4(15)	150	1325,1	3683,8	8,83	8,4 x			dihydronitidin
5(16)	200	1454,7	5138,5	7,27	9,2 x			dihydronitidin, litt mer urent
6(17)	150	937,1	6075,6	6,25	5,9 x			sesamin
7(18)	150	1153,7	7229,3	7,69	7,3 x			sesamin, renere
8(19)	150	767,1	7996,4	5,11	4,8 x			sesamin, litt mer urent
9(20-21)	300	1356,2	9352,6	4,52	8,6 x			pellitorin
10(22-24)	450	1942,9	11295,5	4,32	12,3 x			pellitorin
11(25-27)	550	866,7	12162,2	3,53	5,5 x			pellitorin, litt mer urent
12(28-29)	500	619,5	12781,7	1,73	3,9 x			blanding - pellitorinanalogue(?)
13(30-32)	750	793,1	13574,8	0,83	5,0 x			blanding - pellitorinanalogue(?)
14(33-34)	1000	722	14296,8	0,79	4,6 x			PELLI.analog+mystisk alkaloid(?)
15(35-37)	1500	1536,6	15833,4	1,02	9,7 x			pellitorinanalogue
Totalvekt (mg)		15833,4						
Utbytte (%)		79			100,0			Påsett ca 21 g

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V3								
Z. heitzii bark heksan fraksjon V3, ca 1,4 g, løst i ca 8 ml diklometan (DCM)								
Applisert på Versapak kolonne sfærisk Si gel 40x150 mm (Supelco 97782-U)								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM			1 L					
DCM-5%EtOAc			0,2 L					
DCM-10%EtOAc			0,2 L					
DCM-15%EtOAc			0,2 L					
DCM-20%EtOAc			0,2 L					
DCM-30%EtOAc			0,2 L					
DCM-40%EtOAc			0,2 L					
EtOAc			0,4 L					
Tatt ut fraksjoner à 60 mL (1-40), 100 mL(41)								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase DCM, DCM-5%EtOAc, DCM-10%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Indampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-8)	480	48,5	48,5	0,10	3,8 x			mest fett
2(9-11)	180	70,1	118,6	0,39	5,4 x			terpenoid + alkaloid
3(12)	60	11,6	130,2	0,19	0,9 x			terpenoid
4(13-15)	180	40,8	171,0	0,23	3,2 x			terpenoid
5(16-17)	120	61,7	232,7	0,51	4,8 x			terpenoid
6(18)	60	373,0	605,7	6,22	29,0 x			fett+terpenoid - caryofyllenoksid(?)
7(19-20)	120	531,9	1137,6	4,43	41,3 x			fett+alkaloid-trolig diHnitidin
8(21-28)	480	14,2	1151,8	0,03	1,1 x			fett
9(29-30)	120	7,7	1159,5	0,06	0,6 x			rhoifolin b+x-alkaloid
10(31)	60	15,0	1174,5	0,25	1,2 x			rhoifolin b+x-alkaloid+fett
11(32)	60	66,3	1240,8	1,11	5,2 x			x-alkaloid+litt fett
12(33)	60	23,7	1264,5	0,40	1,8 x			x-alkaloid+litt fett
13(34-42)	580	22,7	1287,2	0,04	1,8 x			fett
Totalvekt (mg)		1287,2						Påsatt ca 1,4 g
Utbytte (%)		92			100,0			

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V3V2								
Z. heitzii bark heksan fraksjon V3V2, ca 70 mg, løst i ca 2 ml (diklormetan) DCM								
Applisert på kromatotronplate 1 mm								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM			fr 1-5					
DCM-20%EtOAc			fr 6-9					
DCM-40%EtOAc			fr10-12					
Tatt ut fraksjoner à 12 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-2)	24	0	0,0	0,00	0,0			
2(3)	12	19,3	19,3	1,61	37,0 x			alkaloider+terp
3(4)	12	28,4	47,7	2,37	54,5 x			terpenoid, litt alkaloid
4(5)	12	3	50,7	0,25	5,8 x			terpenoid
5(6-10)	60	1,4	52,1	0,02	2,7 x			fett, terpenoid
6(11-12)	24	0	52,1	0,00	0,0 x			synlig stoff. RhoiB, ganske rent
Totalvekt (mg)		52,1						Påsatt ca 65 mg
Utbytte (%)		80			100,0			

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V3V6								
Z. heitzii bark fraksjon V3V6, ca 350 mg, løst i ca 1 ml (diklormetan) DCM								
Applisert på kromatotronplate 2 mm								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM			200 mL					
EtOAc			50 mL					
Tatt ut fraksjoner à 12 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-10)	120	2,8	2,8	0,02	0,9			
2(11-13)	36	24,9	27,7	0,69	7,8	x	x	Caryofyllenoksid, uren
3(14-16)	36	64,5	92,2	1,79	20,1	x	x	Caryofyllenoksid, uren
4(17-18)	24	97,7	189,9	4,07	30,4	x	x	Caryofyllenoksid,renere
5(19-21)	36	131,3	321,2	3,65	40,9	x	x	blanding
Totalvekt (mg)		321,2						På satt ca 350 mg
Utbytte (%)		92			100,0			

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V4+V5								
Z. heitzii bark fraksjon V4+5 supernatant etter utkrystallisert dihydronitidin								
Ca 1,2 g, løst i 10,5 ml diklormetan (DCM)								
Filtrert (Schleicher & Schüll 589 papir)								
Applisert på Versapak kolonne Si gel 40x150 mm (Supelco)								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM					0,2 L			
DCM-5%EtOAc					0,1 L			
DCM-10%EtOAc					0,1 L			
DCM-15%EtOAc					0,1 L			
DCM-20%EtOAc					0,1 L			
DCM-25%EtOAc					0,1 L			
DCM-30%EtOAc					0,1 L			
DCM-50%EtOAc					0,1 L			
EtOAc					0,1 L			
Tatt ut fraksjoner à 30 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck).								
Mobilfase: DCM-6%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-13)	390	12,3	12,3	0,03	1,4 x			fett, terpenoid
2(14-15)	60	263,5	275,8	4,39	30,6 x			fett
3(16)	30	179,3	455,1	5,98	20,8 x			fett, terp, alkaloid
4(17)	30	168,3	623,4	5,61	19,5 x			terp, alkaloid
5(18)	30	100,8	724,2	3,36	11,7 x			terp, alkaloid
6(19)	30	40	764,2	1,33	4,6 x			sesamin
7(20)	30	26,4	790,6	0,88	3,1 x			sesamin
8(21)	30	15,2	805,8	0,51	1,8 x			fett, sesamin, alkaloid
9(22)	30	11,2	817,0	0,37	1,3 x			fett, litt alkaloid
10(23-26)	120	16,4	833,4	0,14	1,9 x			fett, litt pellitorin (?)
11(27-34)	240	27,8	861,2	0,12	3,2 x			pellitorin(?)
Totalvekt (mg)		861,2						Påsatt ca 1,2 g
Utbytte (%)		72			100,0			

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V4+5supV4								
Z. heitzii bark V4+5supV4, ca 160 mg, løst i ca 2 ml (diklormetan) DCM								
Applisert på kromatotronplate 2 mm								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM				50 mL	fr1-5			
DCM-2%EtOAc				50 mL	fr6-9			
DCM-4%EtOAc				50 mL	fr10-13			
DCM-6%EtOAc				50 mL	fr14-17			
DCM-10%EtOAc				50 mL	fr18-21			
DCM-30%EtOAc				50 mL	fr22-25			
EtOAc				100 mL	fr26-33			
Tatt ut fraksjoner à 12 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-3%EtOAc, DCM-6%EtOAc, DCM-30%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-12)	144	2,8	2,8	0,02	2,0			
2(13)	12	17,2	20,0	1,43	12,4	x		terpenoid
3(14-15)	24	65,9	85,9	2,75	47,5	x		terp, litt diHnitidin
4(16-17)	24	16,4	102,3	0,68	11,8	x		terp, flere alk, kompleks blanding
5(18)	12	12,3	114,6	1,03	8,9	x		sesamin + noe rart
6(19-20)	24	8	122,6	0,33	5,8	x		fett + rart
7(21)	12	1,8	124,4	0,15	1,3			
8(22-23)	24	2,4	126,8	0,10	1,7			
9(24-27)	48	3,9	130,7	0,08	2,8	x		fett
10(28)	12	0,7	131,4	0,06	0,5			
11(29)	12	0,7	132,1	0,06	0,5			
12(30-31)	24	4,9	137,0	0,20	3,5	x		fett+ukjent alkaloid (3-80+3.85)
13(32-33)	24	1,7	138,7	0,07	1,2			
Totalvekt (mg)		138,7			100,0			Påsatt ca 160 mg
Utbytte (%)		87						

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V4+5supV5								
Z. heitzii bark V4+5supV5, ca 95 mg, løst i ca 2 ml (diklormetan) DCM								
Applisert på kromatotronplate 1 mm								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM-5%EtOAc				50 mL				
DCM-7%EtOAc				50 mL				
DCM-10%EtOAc				50 mL				
DCM-15%EtOAc				50 mL				
DCM-20%EtOAc				50 mL				
DCM-35%EtOAc				50 mL				
Tatt ut fraksjoner à 12 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-5%EtOAc, DCM-20%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-2)	24	1,4	1,4	0,06	1,8			
2(3-4)	24	36,1	37,5	1,50	47,3	x		terpenoid
3(5)	12	20,4	57,9	1,70	26,7	x		terp, dihydronitidin (?)
4(6)	12	7,1	65,0	0,59	9,3	x		terp, dihydronitidin (?)
5(7-8)	24	3	68,0	0,13	3,9	x		terp, rhoifolin (?), annet alkaloid (?)
6(9-10)	24	1,7	69,7	0,07	2,2			
7(11-24)	168	5,5	75,2	0,03	7,2	x		sesamin, litt alkaloid, fett
8(25-27)	36	1,1	76,3	0,03	1,4	x		alkaloid, sesamin
9(28-29)	24	0	76,3	0,00	0,0			
Totalvekt (mg)		76,3		100,0				Påsatt ca 350 mg
Utbytte (%)		80						

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V6+7								
Z. heitzii bark V6+V7, ca 2,05 g, løst i ca 6 ml diklormetan (DCM)								
Applisert på Versapak kolonne sfærisk Si gel 40x150 mm (Supelco 97782-U)								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM				0,3 L				
DCM-20%EtOAc				0,21 L				
EtOAc				0,2 L				
Tatt ut fraksjoner à 15 mL.								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-10%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-20)	300	7	7,0	0,02	0,4 x			fett, litt terpenoid (?)
2(21-23)	45	1211,7	1218,7	26,93	64,3 x			sesamin+terpenoid, noe fett
3(24-25)	30	445,7	1664,4	14,86	23,7 x			relativt rent sesamin
4(26-27)	30	29,7	1694,1	0,99	1,6 x			pellitorinlignende
5(28)	15	10,7	1704,8	0,71	0,6 x			ditto
6(29-31)	45	33,1	1737,9	0,74	1,8 x			ditto
7(32)	15	8,2	1746,1	0,55	0,4 x			ditto
8(33-34)	30	11	1757,1	0,37	0,6 x			ditto
9(35)	200	127	1884,1	0,64	6,7 x			x-alkaloid+pellitorinlignende
Totalvekt (mg)		1884,1						Påsatt ca 2,05 g
Utbytte (%)		92			100,0			

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V6+7V2								
Z. heitzii bark fraksjon V6+7V2, ca 1,2 g, løst i ca 6 ml diklormetan (DCM)								
Applisert på Versapak kolonne sfærisk Si gel 40x150 mm (Supelco 97782-U)								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM-5%EtOAc				0,6 L				
DCM-10%EtOAc				0,6 L				
Tatt ut fraksjoner à 15 mL (fraksjon 1-40), 100 mL (fraksjon 41), 250 mL (fraksjon 42)								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-5%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-12)	180	8,0	8,0	0,04	0,8 x			fett, terpenoid
2(13-14)	30	9,5	17,5	0,32	0,9 x			mest fett, noe interessant?
3(15-18)	60	52,2	69,7	0,87	4,9 x			fett
4(19-21)	45	169,5	239,2	3,77	16,0 x			terpenoid
5(22-25)	60	206,9	446,1	3,45	19,6 x			terp, diHnit
6(26-34)	125	70,1	516,2	0,56	6,6 x			svært blandet!
7(35-41)	190	497,3	1013,5	2,62	47,0 x			sesamin
8(42)	250	44,3	1057,8	0,18	4,2 x			sesamin, fett
Totalvekt (mg)		1057,8						Påsatt ca 1.2 g
Utbytte (%)		88			100,0			

Z heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V6-7V2V4								
Z heitzii bark heksan fraksjon V6+7V2V4, ca 160 mg								
Applisert på kromatotronplate 2 mm								
Kondisjonert i heksan-5%EtOAc								
Eluert med:								
heksan-5%EtOAc				fr 1-5				
heksan-6%EtOAc				fr 6-9				
heksan-7%EtOAc				fr 10-12				
heksan-8%EtOAc				fr 13-16				
heksan-10%EtOAc				fr 17-20				
heksan-15%EtOAc				fr 21-24				
heksan-20%EtOAc				fr 25-29				
29 fraksjoner à ca 15 ml								
TLC Si gel NP F254 (Merck)								
Mobilfase: heksan-15%EtOAc								
Påvisning UV 254, UV 366, ceric								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	vekt mg	kons mg/ml	Akkum.	% av	NMR	NMR	Kommentar
	ml	mg	mg/ml	vekt	total	1H	13C	
1(1-11)	165	3,8	0,02	3,8	11			TLC: tom
2(12-13)	30	6	0,20	9,8	17	x		TLC: identisk med 14-16
3(14-16)	45	11,7	0,26	21,5	34	x		
4(17-18)	30	10,9	0,36	32,4	32	x		TLC: identisk med 14-16
5(19-29)	165	2	0,01	34,4	6			TLC:tom
Totalvekt (mg)		34,4						Påsatt ca 160 mg
Utbytte (%)		22						

Z. heitzii bark heksanekstrakt									
Fraksjon V6+7V2V5									
Z. heitzii bark heksan fraksjon V6-7V2V5, ca 200 mg									
Applisert på kromatotronplate 2mm									
Kondisjonert i heksan-5%EtOAc									
Eluert med:									
heksan-5%EtOAc				fr 1-7					
heksan-10%EtOAc				fr 8-18					
heksan-15%EtOAc				fr 19-23					
heksan-20%EtOAc				fr 23-28					
heksan-40% EtOAc				fr 28-30					
Fraksjoner à 15 ml, unntatt fraksjon 30 à 75 ml									
TLC Si gel NP F254 (Merck)									
Mobilfase: heksan-15%EtOAc									
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric									
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet									
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Kons. mg/ml	Akkum. vekt	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar	
1(1-6)	90	0	0,00	0	0				
2(7-12)	90	87,9	0,98	87,9	56	x			
3(13)	15	39,2	2,61	127,1	25	x			
4(14)	15	12,9	0,86	140	8	x			
5(15-17)	45	10,6	0,24	150,6	7	x			
6(18-19)	30	1,1	0,04	151,7	1				
7(20-23)	60	4,7	0,08	156,4	3	x		dihydronitidin	
8(24-30)	165	0,6	0,00	157	0				
Totalvekt (mg)		157						Påsett ca 200 mg	
Utbytte (%)		79							

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V6-7V9								
Z. heitzii bark heksan fraksjon V6-7V9, ca 100 mg, løst i ca 8 ml diklormetan (DCM)								
Applisert på kromatotronplate 1 mm								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM-12%EtOAc				50 mL				
DCM-14%EtOAc				50 mL				
DCM-16%EtOAc				50 mL				
DCM-18%EtOAc				50 mL				
DCM-20%EtOAc				50 mL				
DCM-25%EtOAc				50 mL				
DCM-40%EtOAc				50 mL				
Tatt ut fraksjoner à 12 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-20%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-3)	36	7,7	7,7	0,21	8,7 x			lite interessant
2(4-7)	48	9,9	17,6	0,21	11,1 x			terpenoid
3(8-10)	36	5,7	23,3	0,16	6,4 x			rhoifolin b + fett
4(11-13)	36	11	34,3	0,31	12,4 x			rhoifolin b, alkaloid x, fett
5(14-17)	48	13	47,3	0,27	14,6 x			alkaloid x, fett
6(18-20)	36	5,1	52,4	0,14	5,7 x			alkaloid x
7(21-27)	84	32,4	84,8	0,39	36,4 x			alkaloid x - rent
8(28-29)	24	4,1	88,9	0,17	4,6 x			alkaloid x
Totalvekt (mg)		88,9			100,0			Påsett ca 100 mg
Utbytte (%)		89						

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V9+V10								
Z. heitzii bark heksan V9+V10, ca 3,2 g, løst i ca 9 ml diklormetan (DCM)								
Applisert på Versapak kolonne sfærisk Si gel 40x150 mm (Supelco 97782-U)								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM- 10%EtOAc				0,6 L				
DCM- 15%EtOAc				0,3 L				
EtOAc				0,3 L				
Tatt ut fraksjoner à 30 mL (fraksjon 1-24), 300 mL (fraksjon25)								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-5%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-4)	120	5,6	5,6	0,05	0,2 x			fett
2(5)	30	145,9	151,5	4,86	4,7 x			fett
3(6-7)	60	139,9	291,4	2,33	4,5 x			fett,sesamin
4(8)	30	188,3	479,7	6,28	6,1 x			sesamin
5(9)	30	226,5	706,2	7,55	7,4 x			sesamin,mystisk
6(10-18)	270	1750,6	2456,8	6,48	56,8 x			pellitorin
7(19-22)	120	184,6	2641,4	1,54	6,0 x			pellitorin
8(23-24)	60	38,5	2679,9	0,64	1,2 x			pellitorinanalogue?
9(25)	300	400,8	3080,7	1,34	13,0 x			pellitorinanalogue?
Totalvekt (mg)		3080,7						Påsett ca 3,2 g
Utbytte (%)		96			100,0			

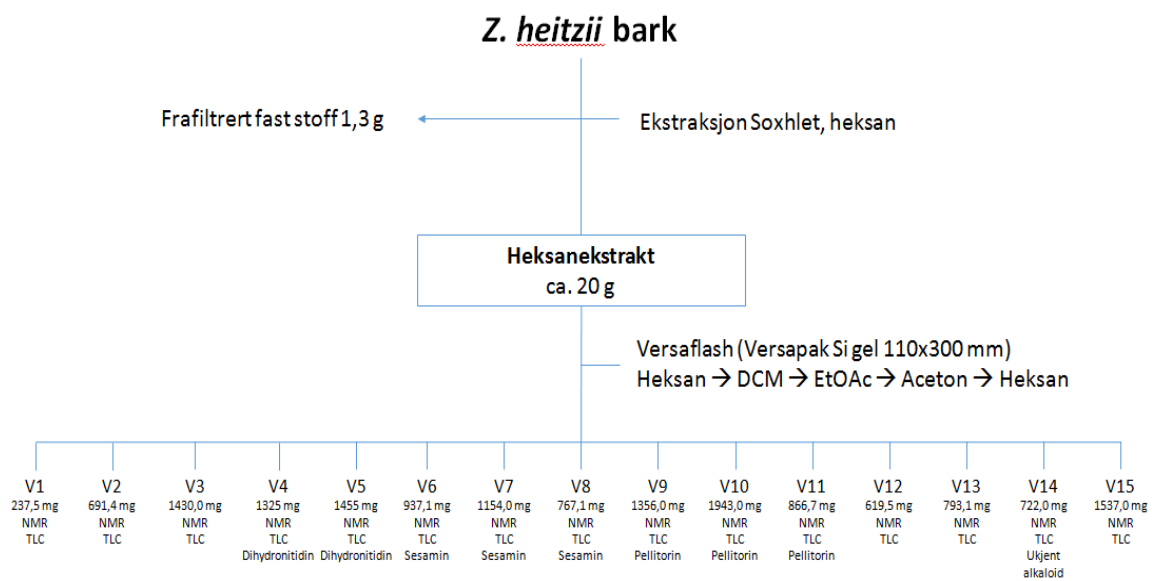
Z. heitzii bark heksan								
Fraksjon V14								
Z. heitzii bark V14, ca 0,7 g, løst i ca 10 ml diklormetan (DCM)								
Noe uløst - ca 0.05 g								
Applisert på Versapak kolonne sfærisk Si gel 40x150 mm (Supelco 97782-U)								
Kondisjonert med DCM								
Eluert med:								
DCM				0,15 L				
DCM-10%EtOAc				0,25 L				
DCM-20%EtOAc				0,25 L				
DCM-30%EtOAc				0,25 L				
DCM-40%EtOAc				0,25 L				
DCM-50%EtOAc				0,25 L				
EtOAc				0,4 L				
Tatt ut fraksjoner à 60 mL (fraksjon 1-4 og 35-42), 30 mL (fraksjon 5-34)								
TLC Si gel 60F254 (Merck).								
Mobilfase: DCM-50%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
TLC uløst: 26-28								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1)	60	9,8	9,8	0,16	1,6	x		fett
2(2-13)	450	7,1	16,9	0,02	1,2	x		fett+div.
3(14-17)	120	13,4	30,3	0,11	2,2	x		fett+div.
4(18-22)	150	36,4	66,7	0,24	6,0	x		alkaloider, kompleks bl.
5(23-24)	60	28,5	95,2	0,48	4,7	x	x	alkaloid
6(25)	30	16,7	111,9	0,56	2,8	x		alkaloid
7(26-28)	90	90,4	202,3	1,00	15,0	x	x	alkaloid
8(29-31)	90	84,7	287,0	0,94	14,0	x		alkaloid+pellitorinlign.
9(32-35)	150	93,2	380,2	0,62	15,5	x		pellitorinlign.
10(36-37)	120	50,5	430,7	0,42	8,4	x		pellitorinlign.
10(38-39)	120	101,4	481,6	0,85	16,8	x	x	pellitorinlign.
11(40-42)	180	71,1	552,7	0,40	11,8	x		fett?
Bunnfall, ikke påsatt kolonne						x	x	alkaloid
Totalvekt (mg)		603,2						Påsatt ca 0.65 g
Utbytte (%)		93			100,0			

Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V14V7								
Z. heitzii bark heksan fraksjon V14V7, ca 90 mg, løst i ca 3 ml kloroform (CHCl ₃)								
Applisert på kromatotronplate 1 mm								
Kondisjonert med diklormetan (DCM)								
Eluert med:								
DCM-10%EtOAc				50 mL				
DCM-12%EtOAc				50 mL				
DCM-14%EtOAc				50 mL				
DCM-17%EtOAc				50 mL				
DCM-20%EtOAc				50 mL				
DCM-25%EtOAc				50 mL				
DCM-30%EtOAc				50 mL				
DCM-40%EtOAc				50 mL				
EtOAc				50 mL				
Tatt ut fraksjoner à 12 ml, unntatt fraksjon 35 à 50 mL)								
TLC Si gel 60F254 (Merck).								
Mobilfase: DCM-20%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg mg	Akkum. vekt	Kons. mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-5)	60	1,0	1,0	0,02	1,5			
2(6-9)	48	3,0	4,0	0,06	4,6	x		
3(10)	12	0,8	4,8	0,07	1,2			
4(11-13)	36	5,0	9,8	0,14	7,6	x		
5(14-15)	24	3,6	13,4	0,15	5,5	x		
6(16-21)	72	7,0	20,4	0,10	10,7	x		
7(22-29)	96	35,1	55,5	0,37	53,7	x		
8(30-35)	110	9,9	65,4	0,09	15,1	x		
Totalvekt (mg)		65,4						Påsett ca 90 mg
Utbytte (%)		73			100,0			

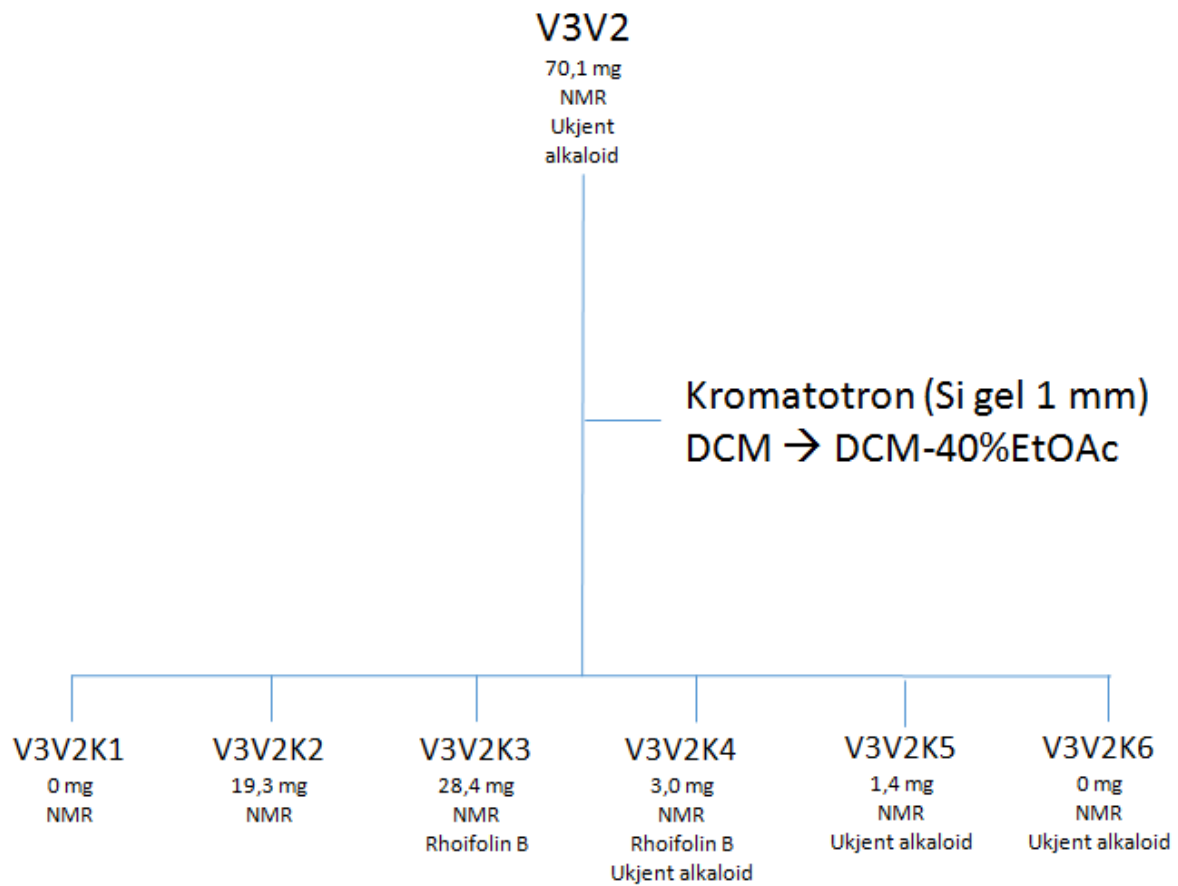
Z. heitzii bark heksanekstrakt								
Fraksjon V14V8								
Z. heitzii bark heksan fraksjon V14V8, ca 80 mg, løst i ca 3 ml kloroform (CHCl3)								
Applisert påkromatotronplate 1 mm, kond. med DCM								
Eluert med:								
DCM				50 mL				
DCM-5%EtOAc				50 mL				
DCM-10%EtOAc				50 mL				
DCM-12%EtOAc				50 mL				
DCM-14%EtOAc				50 mL				
DCM-17%EtOAc				50 mL				
DCM-20%EtOAc				50 mL				
DCM-25%EtOAc				50 mL				
DCM-30%EtOAc				50 mL				
DCM-40%EtOAc				50 mL				
Tatt ut fraksjoner à 12 mL								
TLC Si gel 60F254 (Merck)								
Mobilfase: DCM-20%EtOAc								
Påvisning: UV 254, UV 366, ceric								
Slått sammen fraksjoner som indikert fra TLC								
Inndampet rotavapor, tørket oljevakuum, veiet								
Fraksjon	Volum ml	Vekt mg	Akkum vekt	Kons mg/ml	% av total	NMR 1H	NMR 13C	Kommentar
1(1-17)	204	0,4	0,4	0,00	1,0			
2(18-19)	24	0,7	1,1	0,03	1,7			
3(20-24)	60	8,3	9,4	0,14	19,9	x		uren, alkaloid-holdig
4(25-29)	60	6,9	16,3	0,12	16,5			
5(30-37)	96	23,6	39,9	0,25	56,6	x		hovedalkaloid ulik dihydronitidin
6(38-41)	48	1,8	41,7	0,04	4,3			
Totalvekt (mg)		41,7						
Utbytte (%)		52		100,0				Påsatt ca 80 mg

9.2 Flytskjemaer

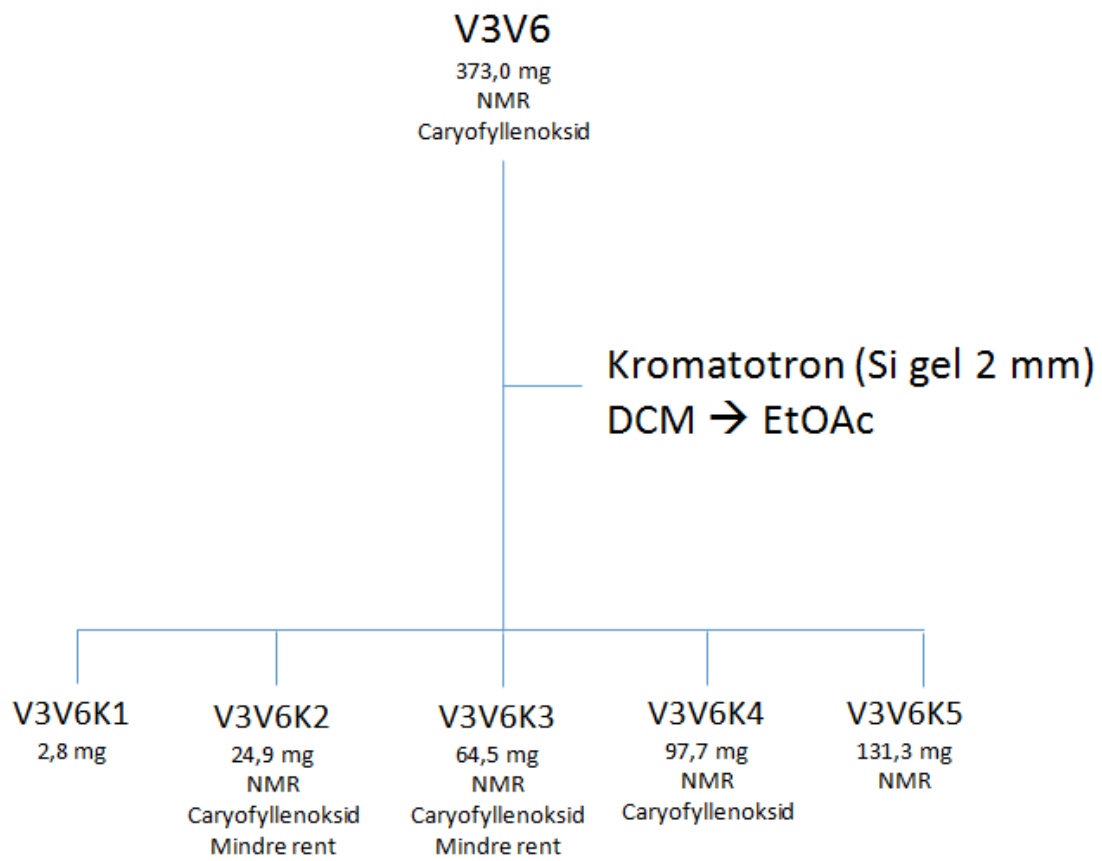
9.2.1 Flytskjema 1



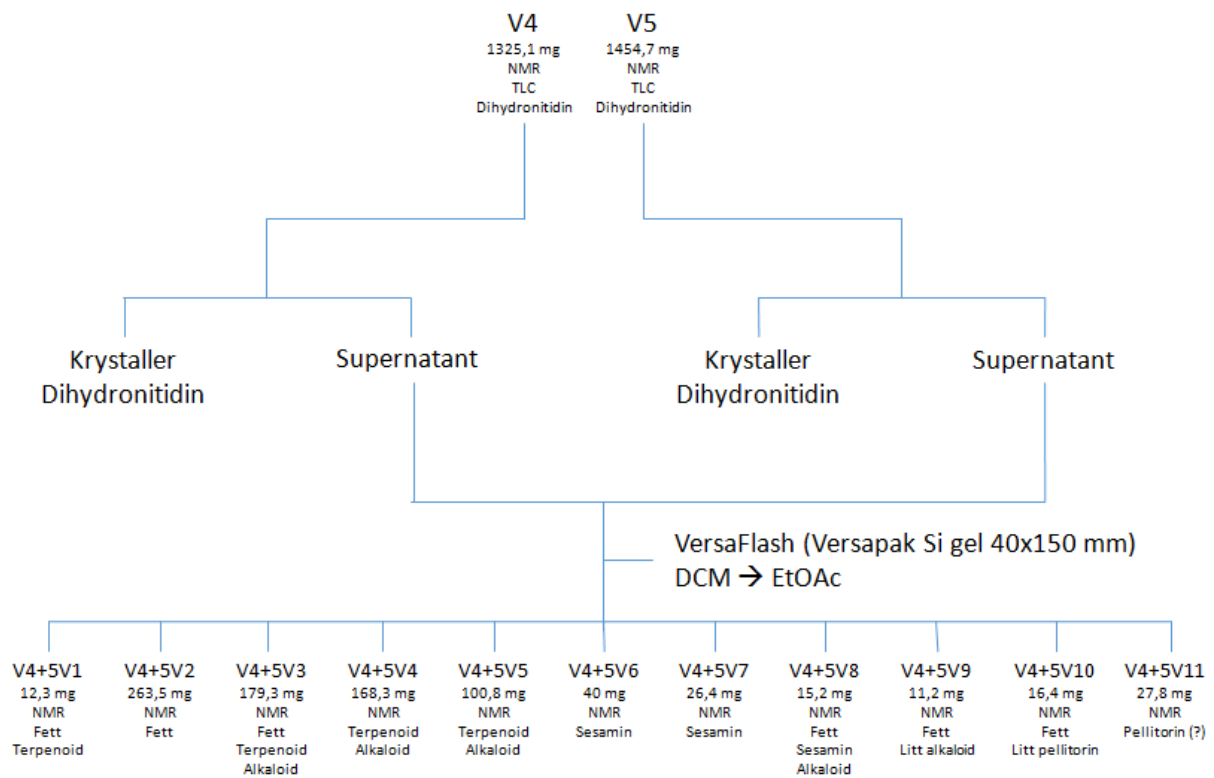
9.2.2 Flytskjema 2



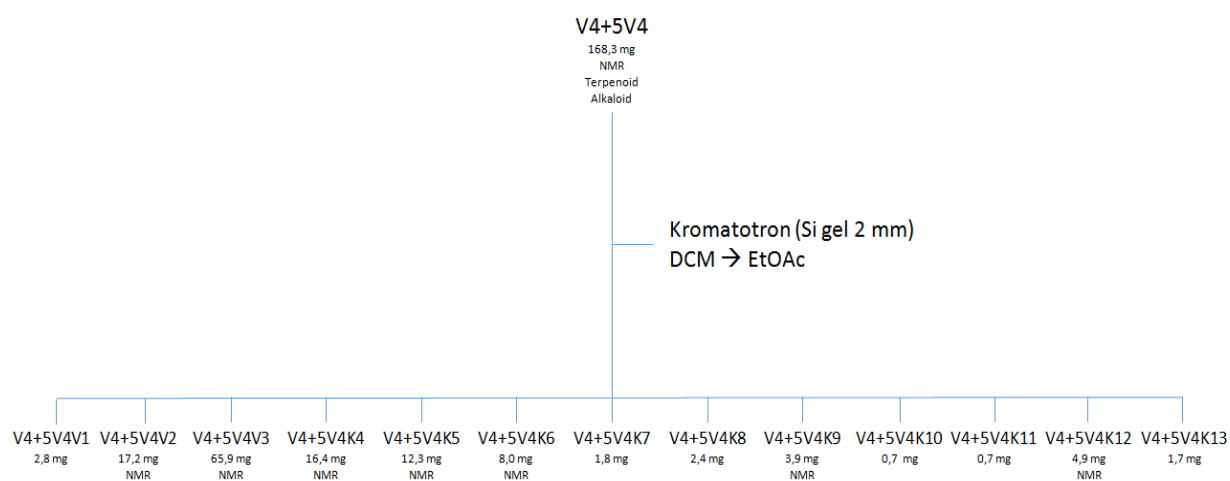
9.2.3 Flytskjema 3



9.2.4 Flytskjema 4

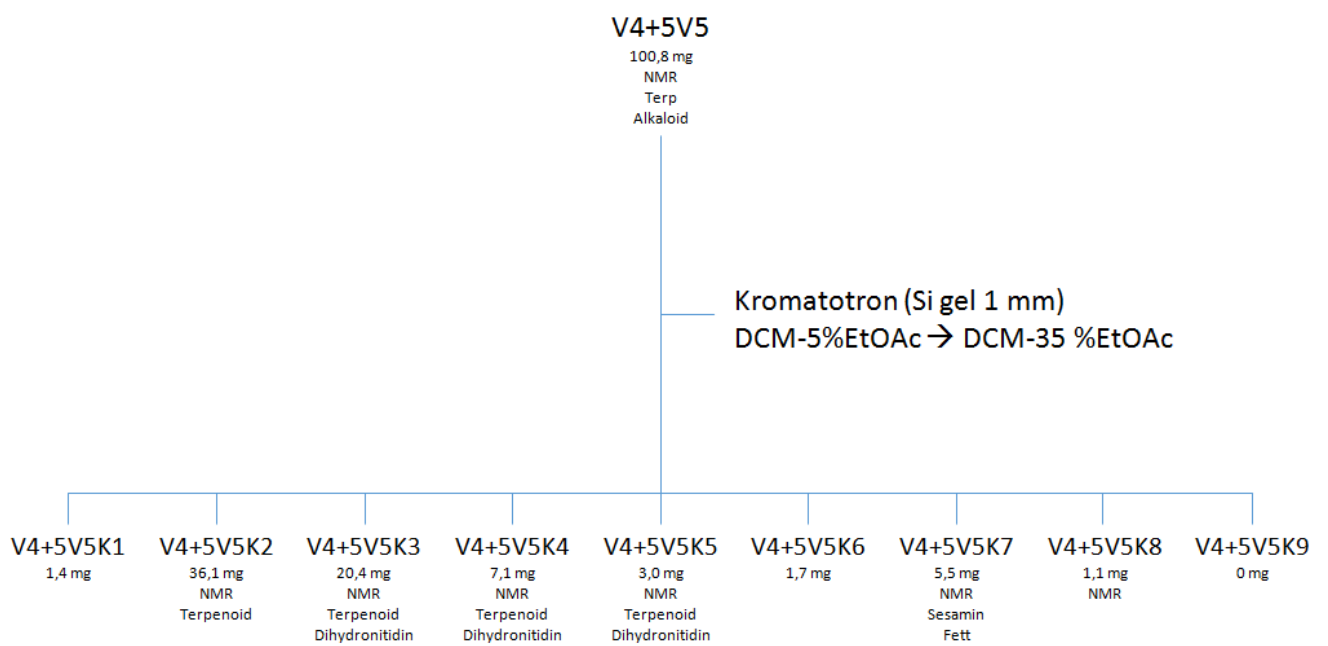


9.2.5 Flytskjema 5

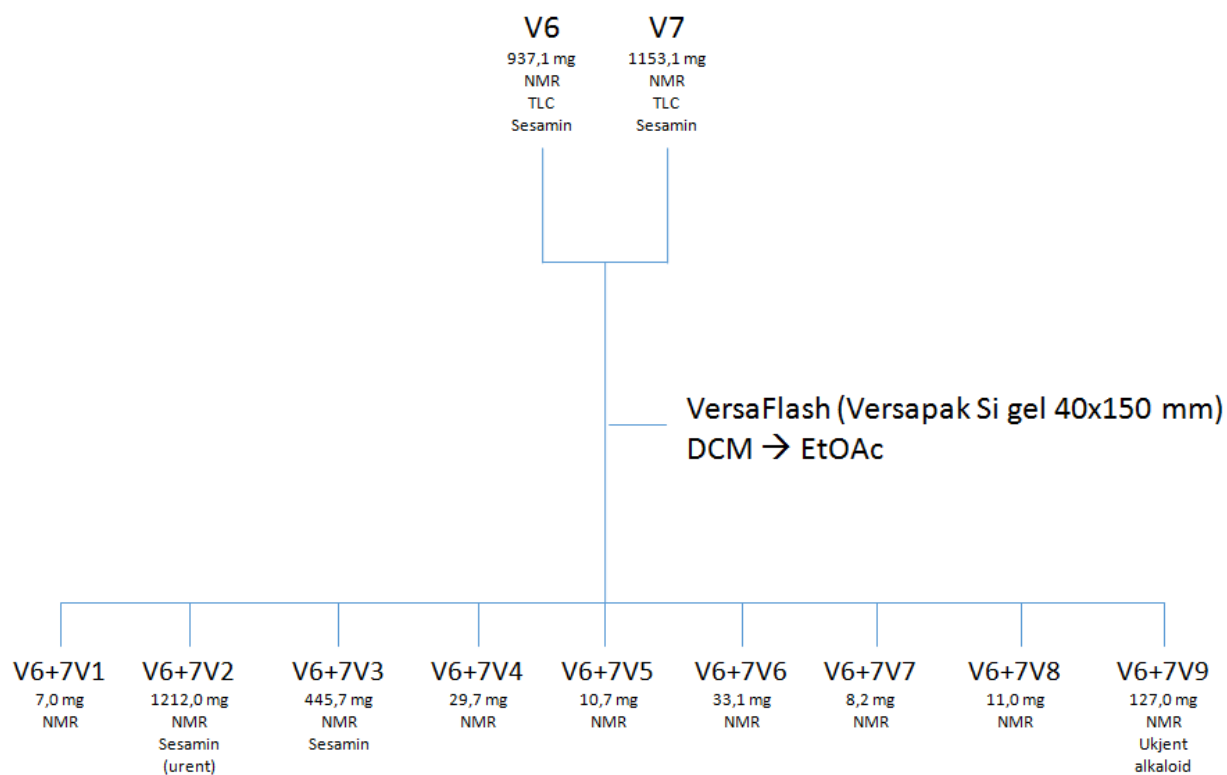


9.2.6 Flytskjema 6

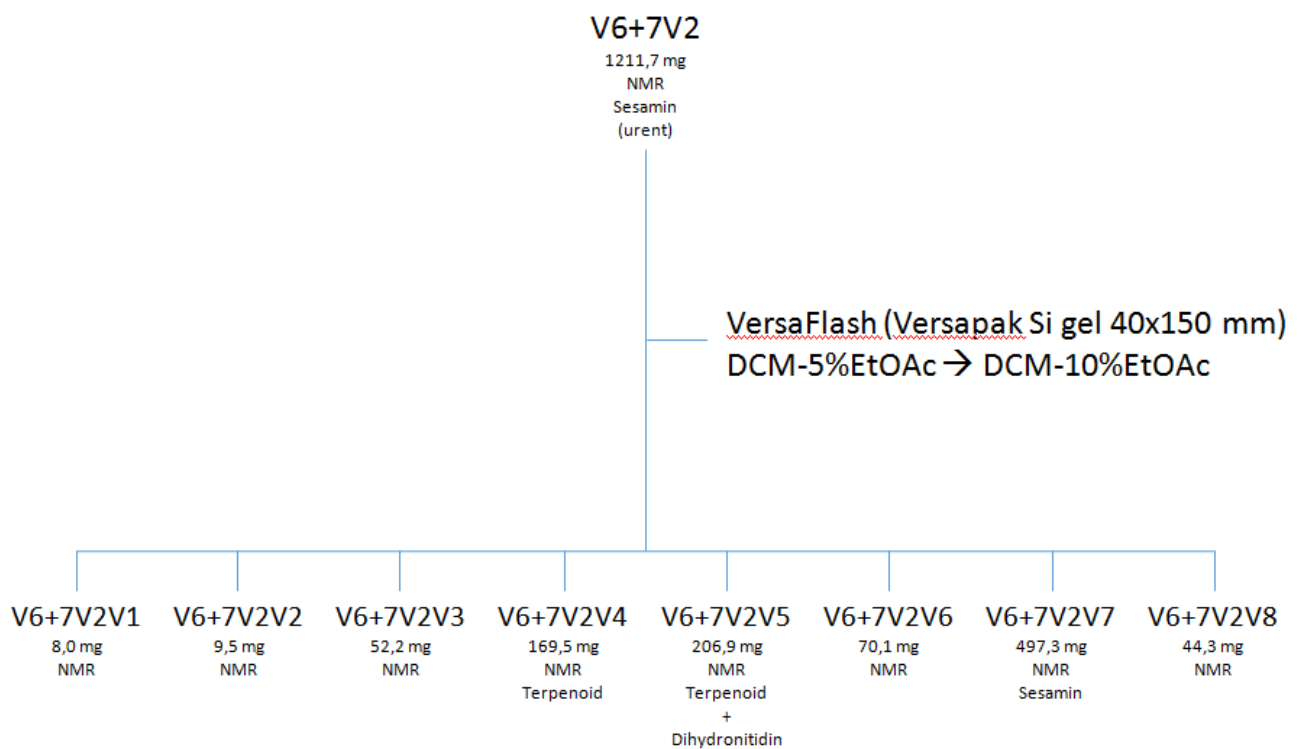
9.2.7



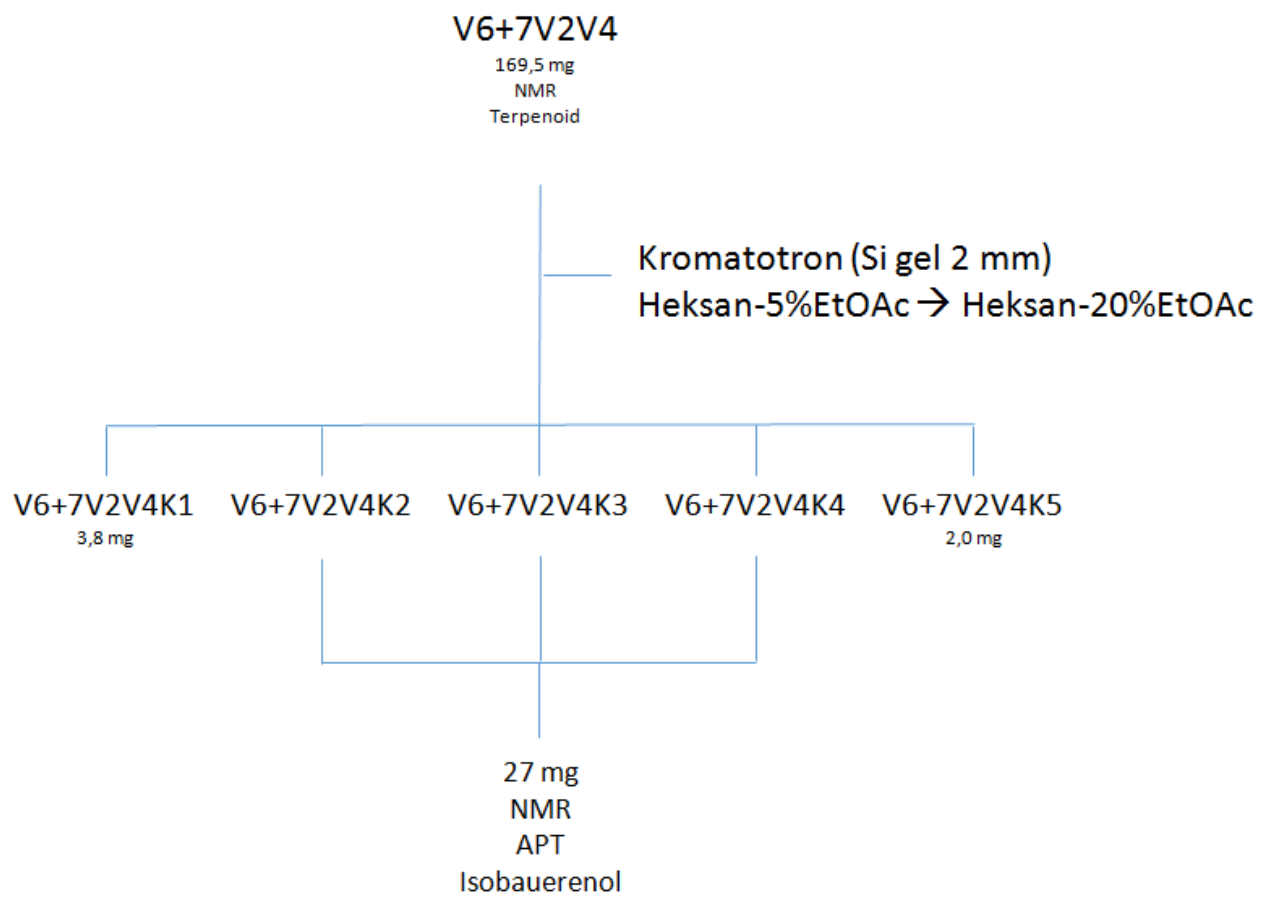
Flytskjema 7



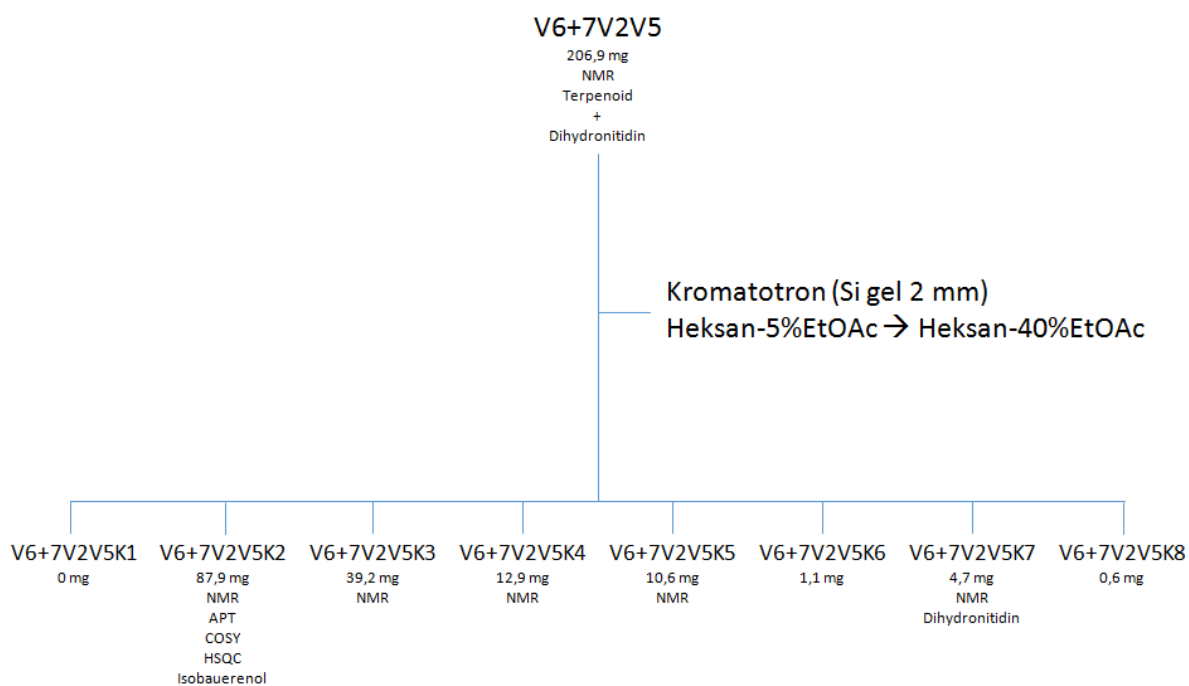
9.2.8 Flytskjema 8



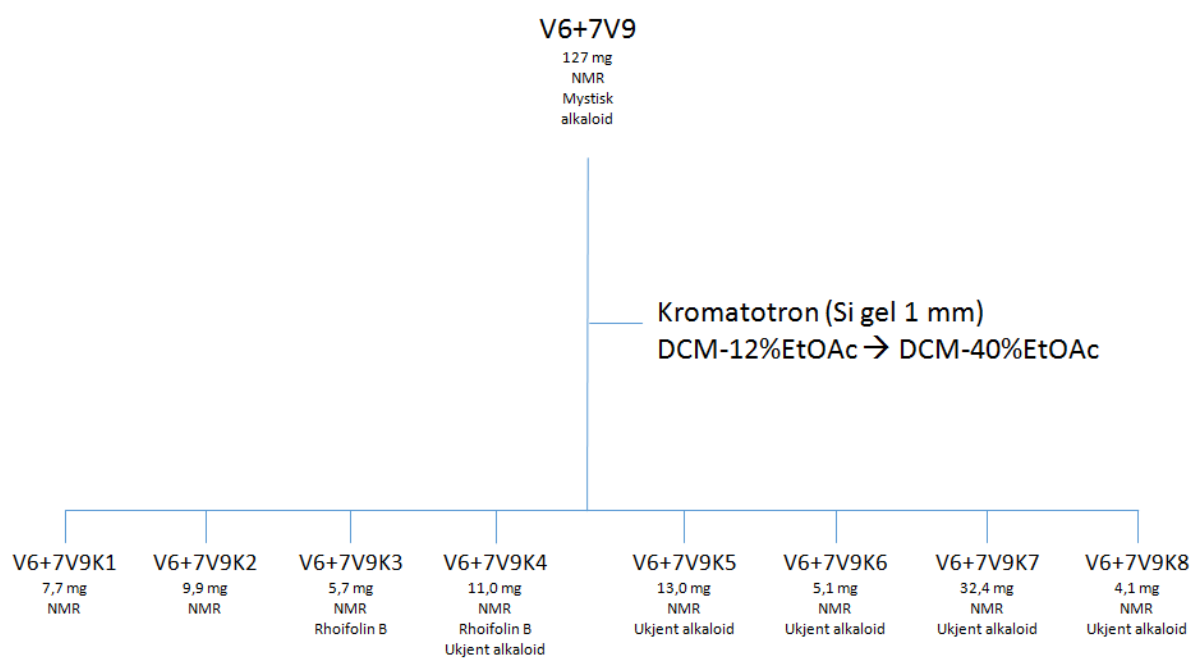
9.2.9 Flytskjema 9



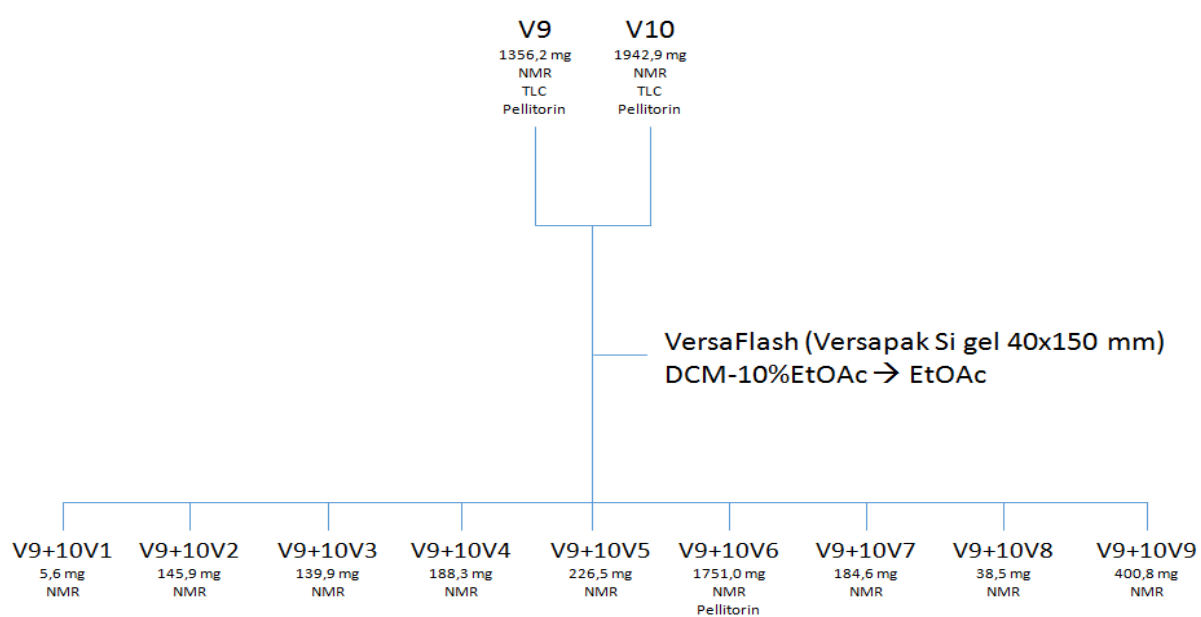
9.2.10 Flytskjema 10



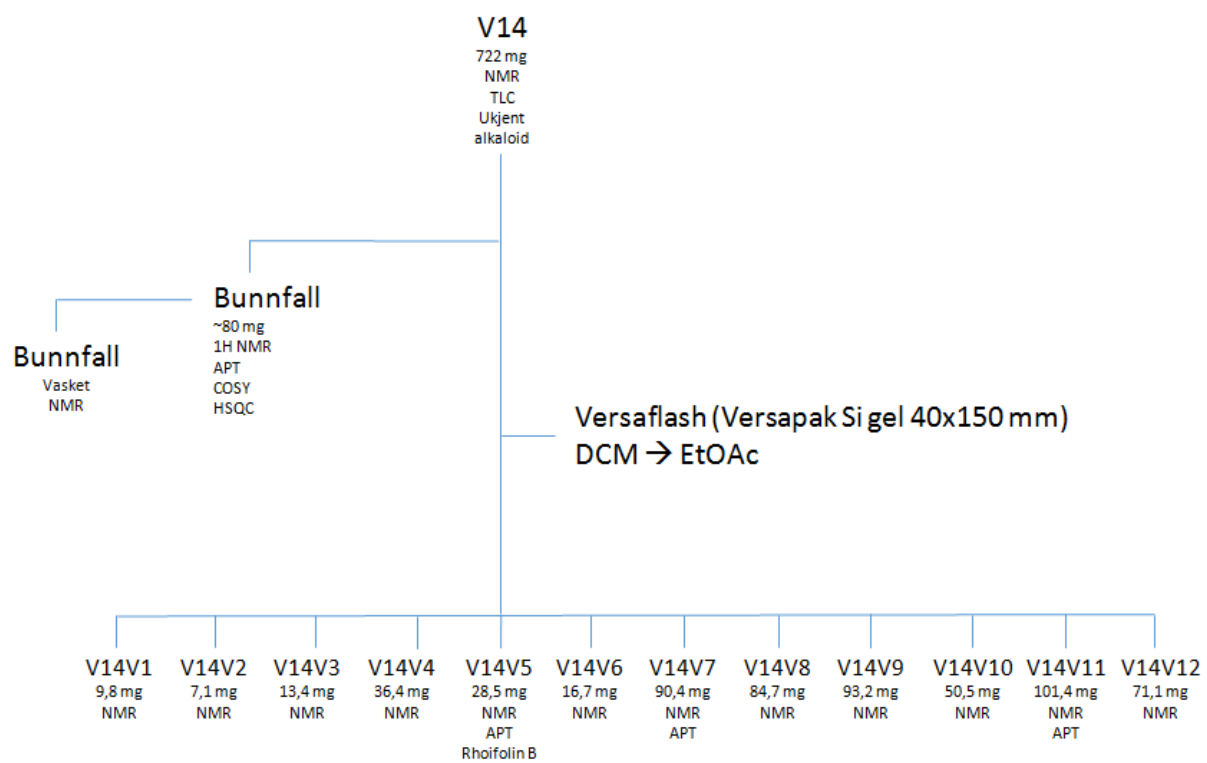
9.2.11 Flytskjema 11



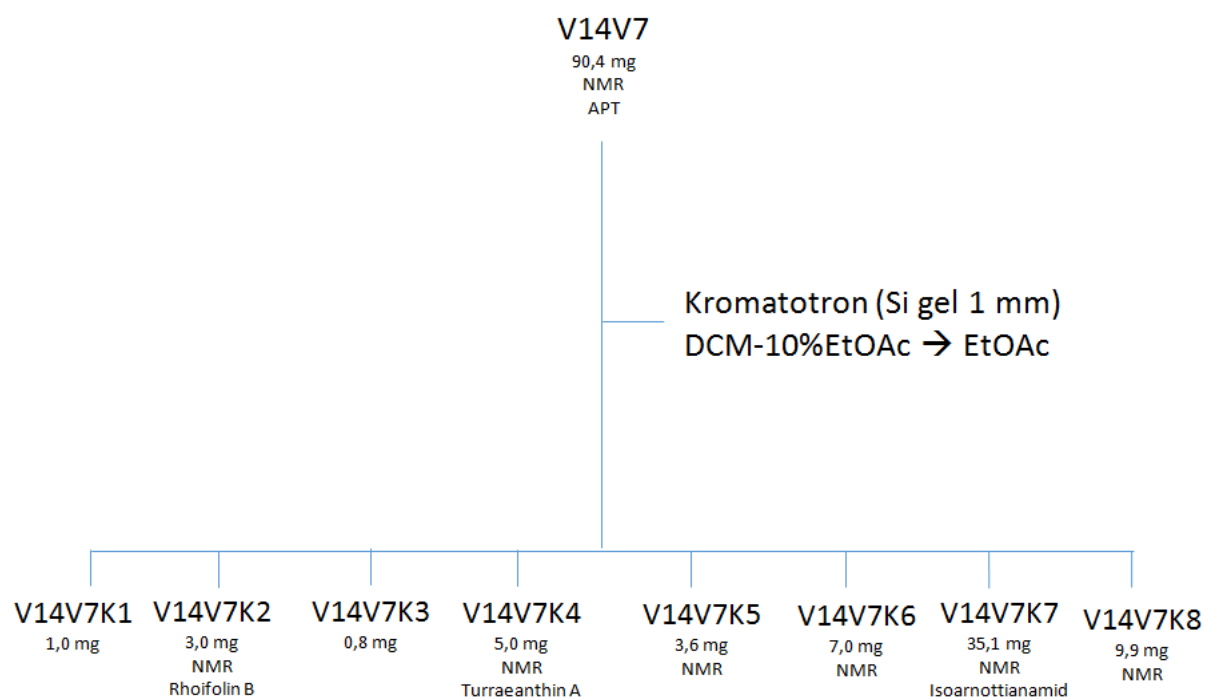
9.2.12 Flytskjema 12



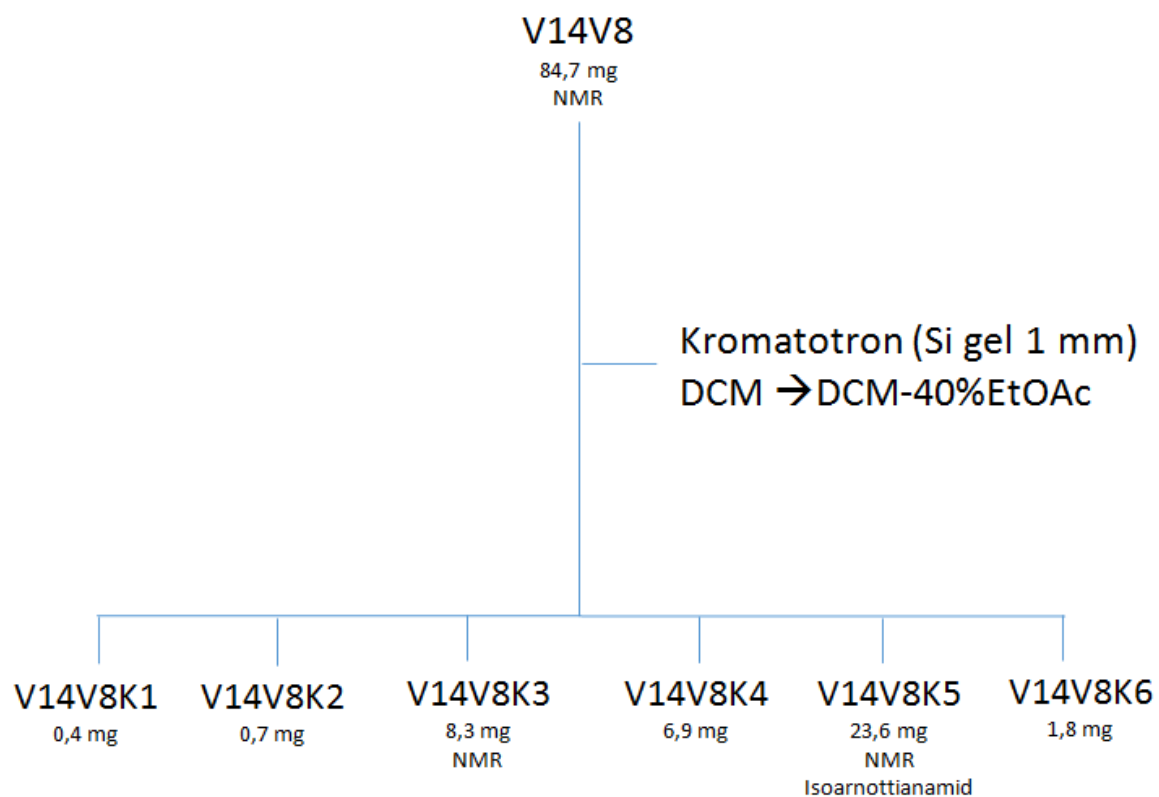
9.2.13 Flytskjema 13



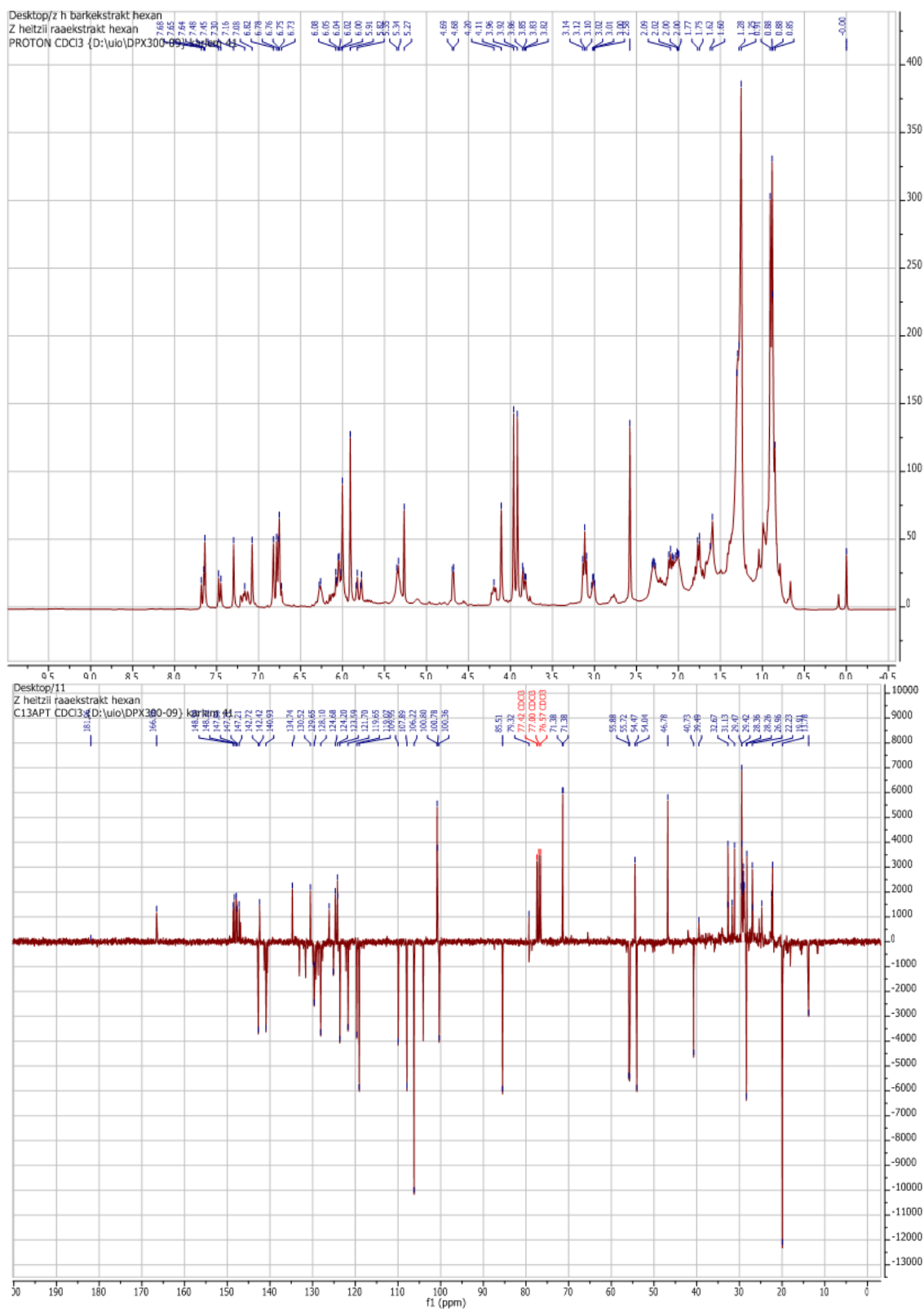
9.2.14 Flytskjema 14



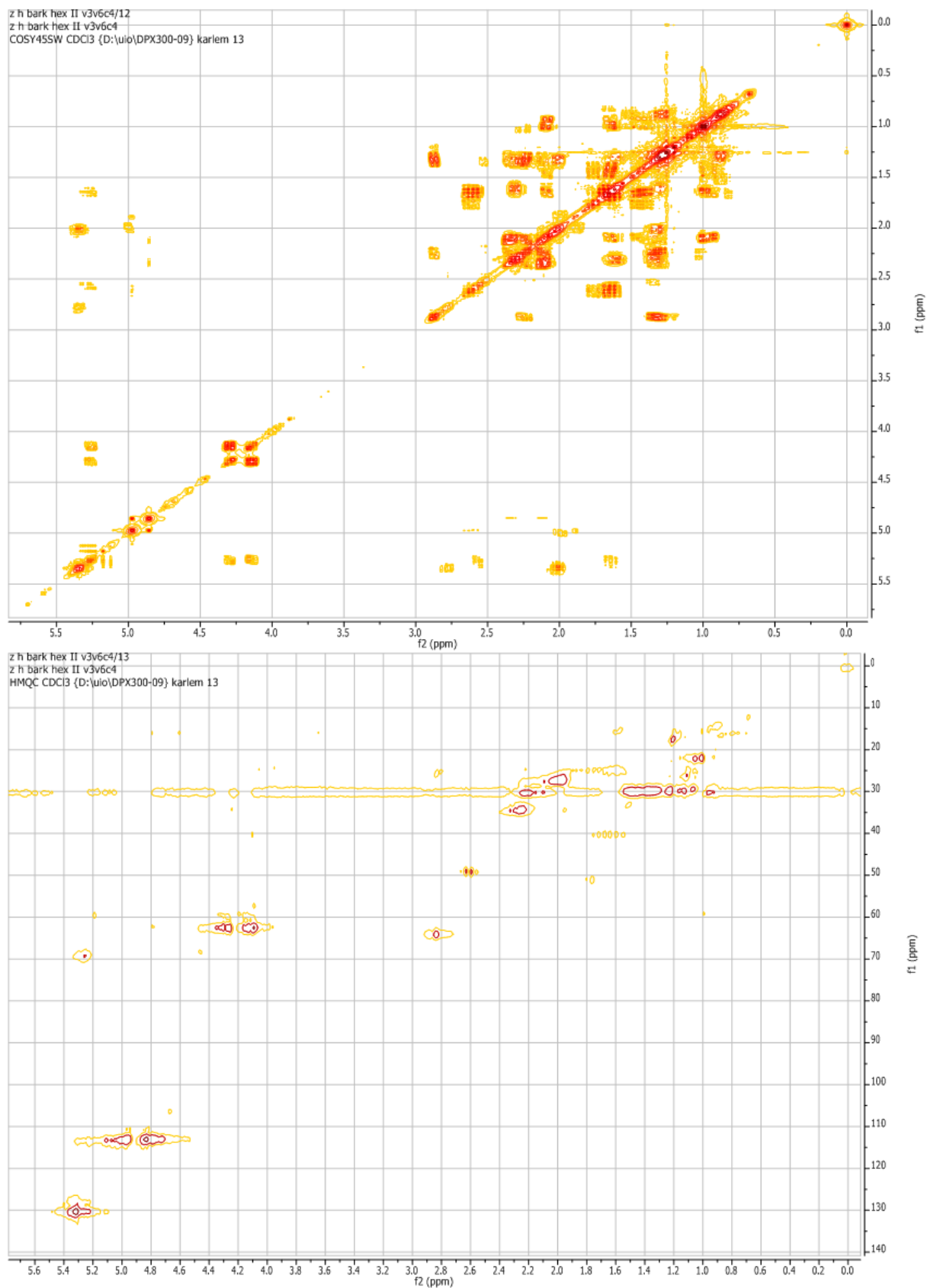
9.2.15 Flytskjema 15



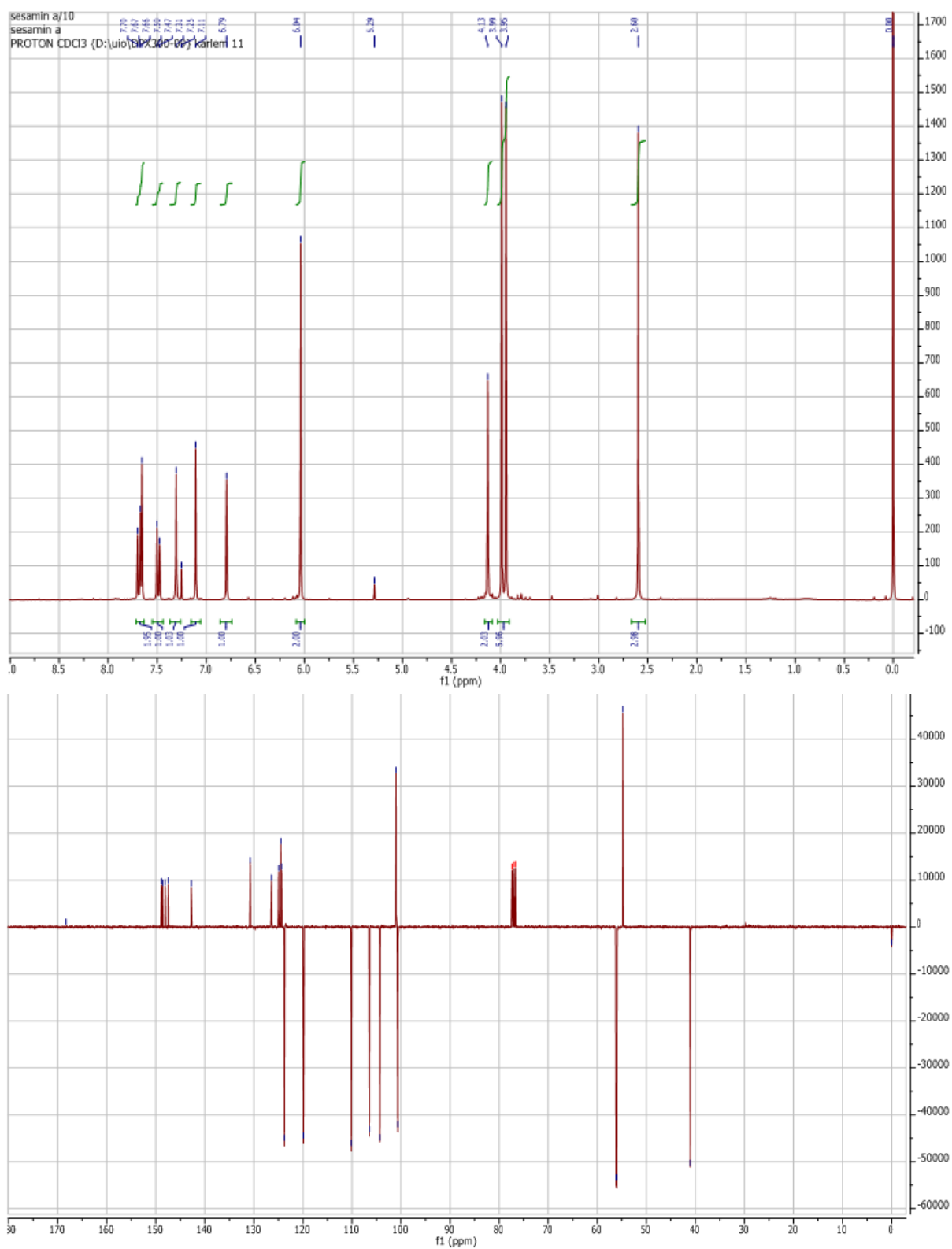
9.3 NMR-spektre



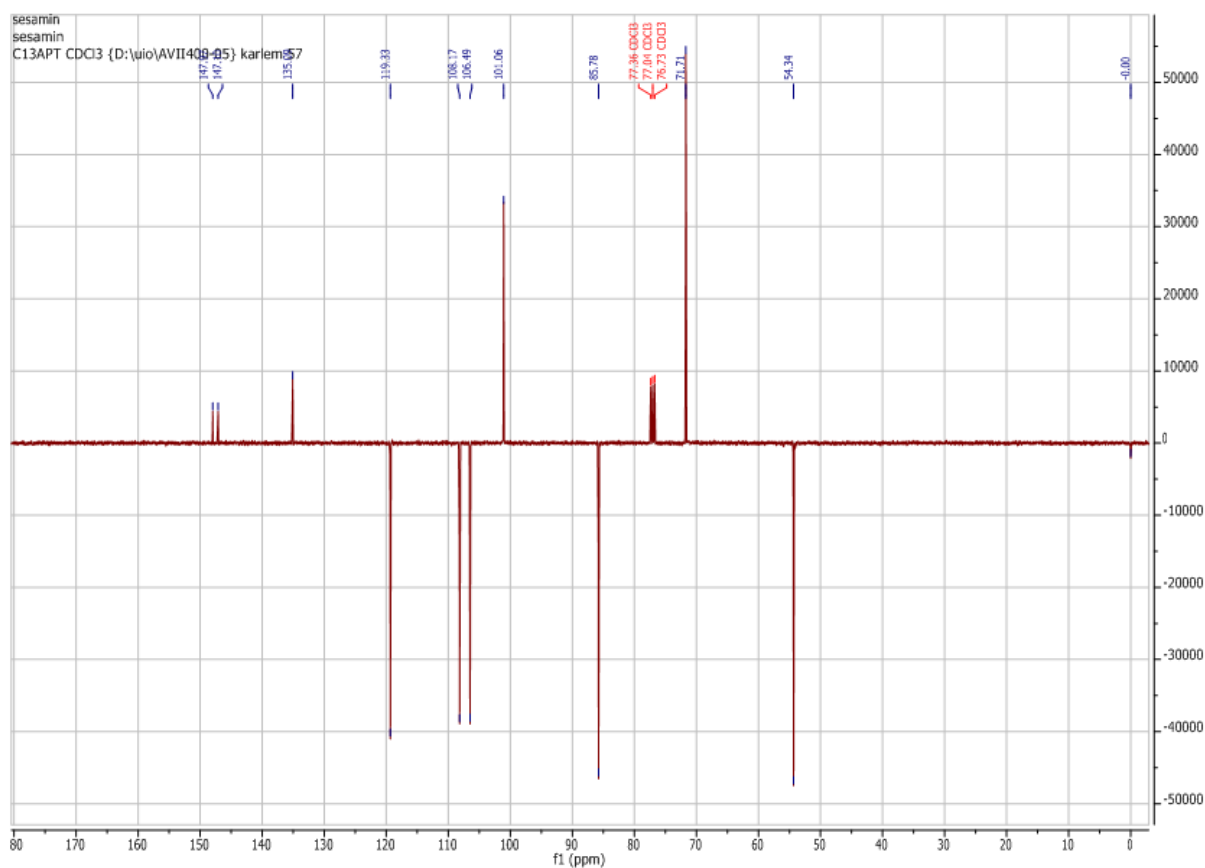
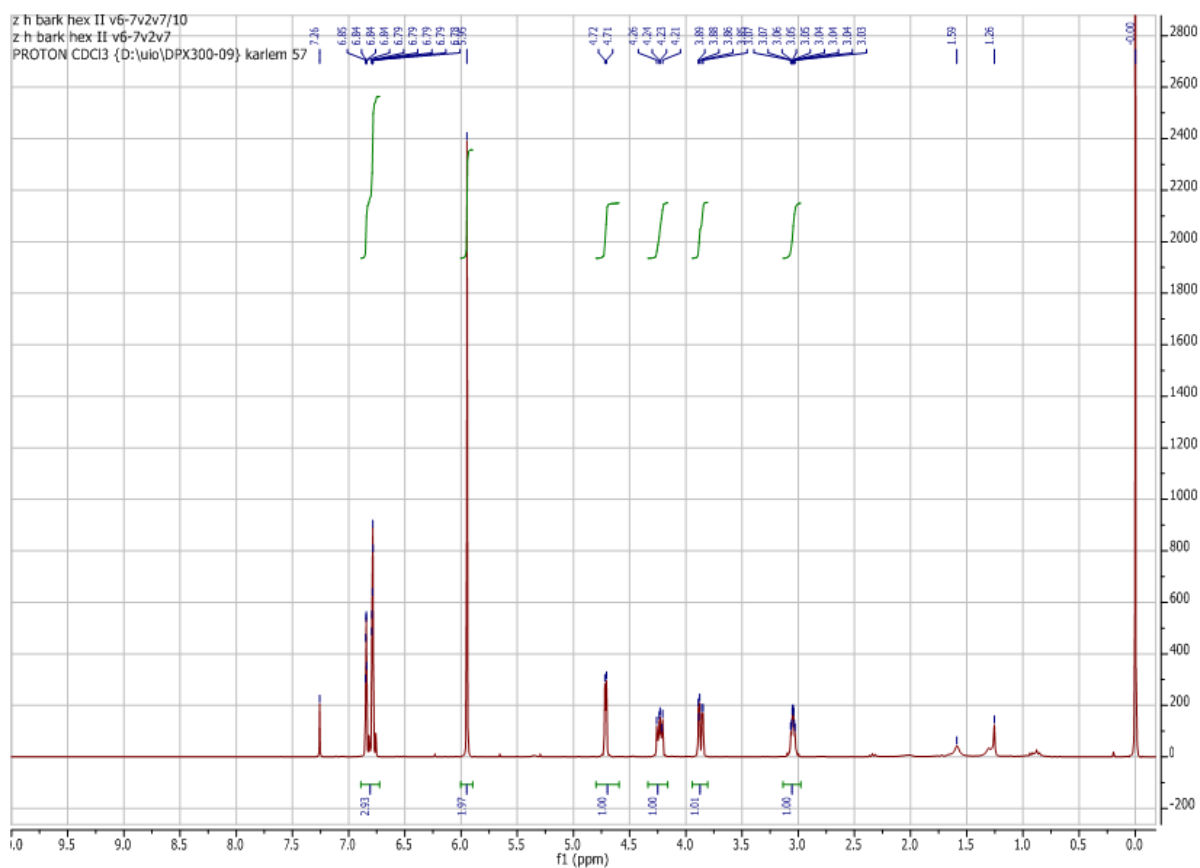
Vedlegg A. 1 H og ¹³C (APT) NMR spektra av heksan råekstrakt av *Z. heitzii* bark



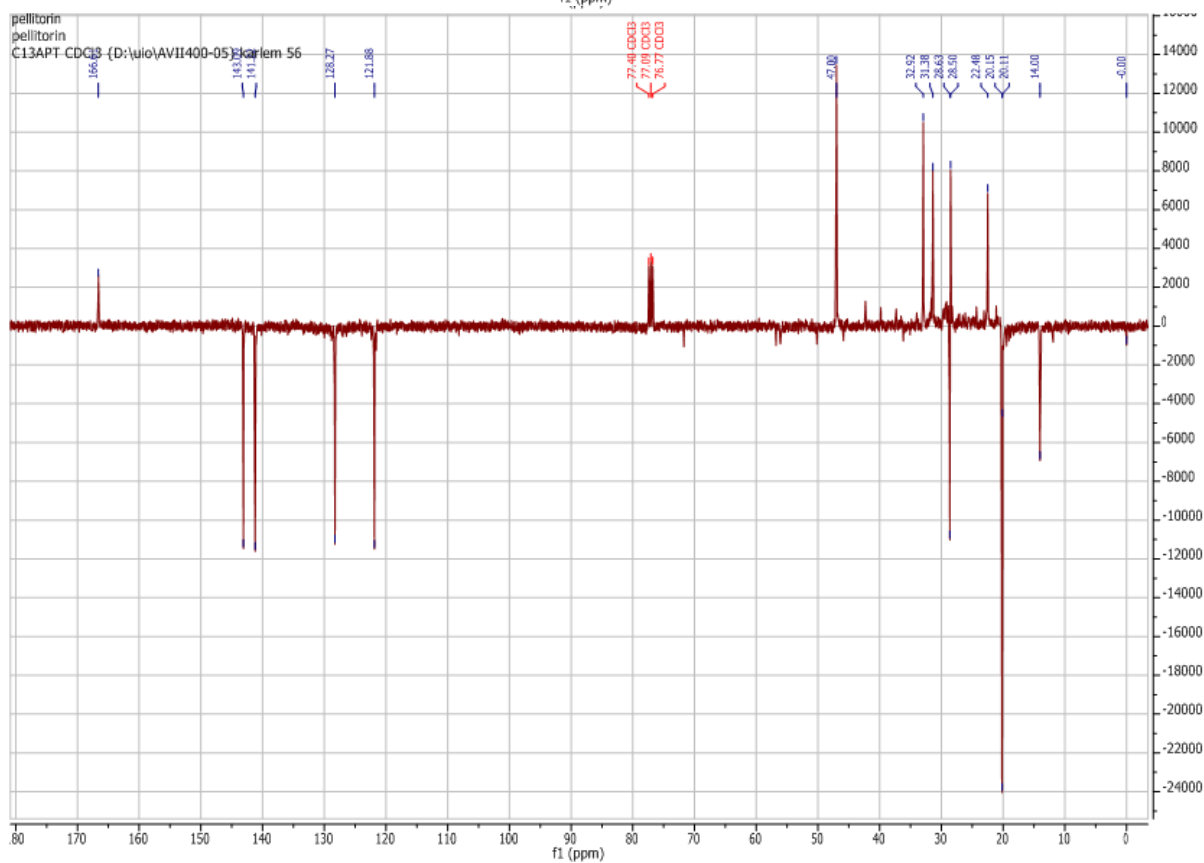
Vedlegg B-2. COSY og HSQC NMR spektra av caryofyllenoksid



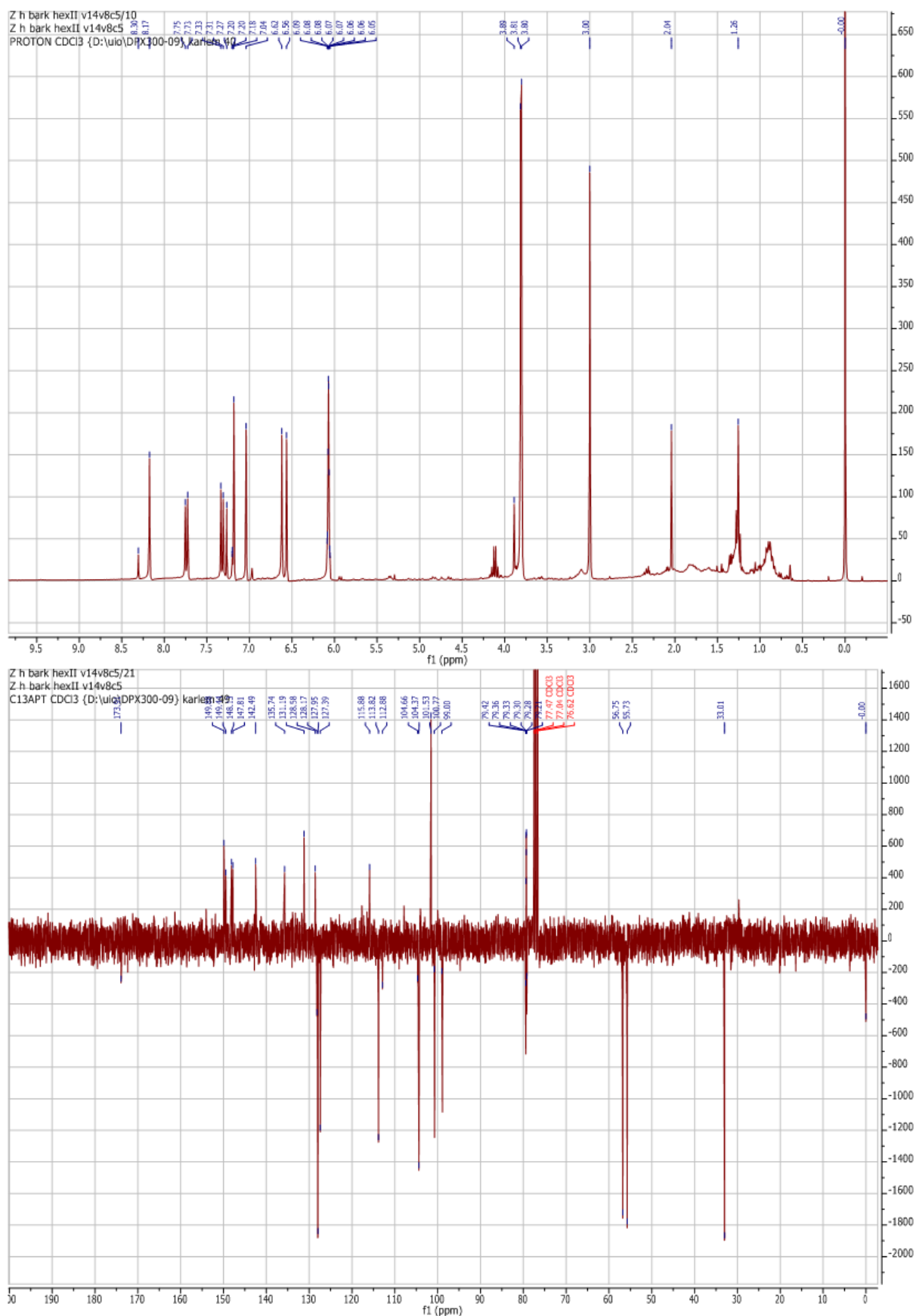
Vedlegg C. ^1H NMR og ^{13}C (APT) NMR spektra av dihydronitidin



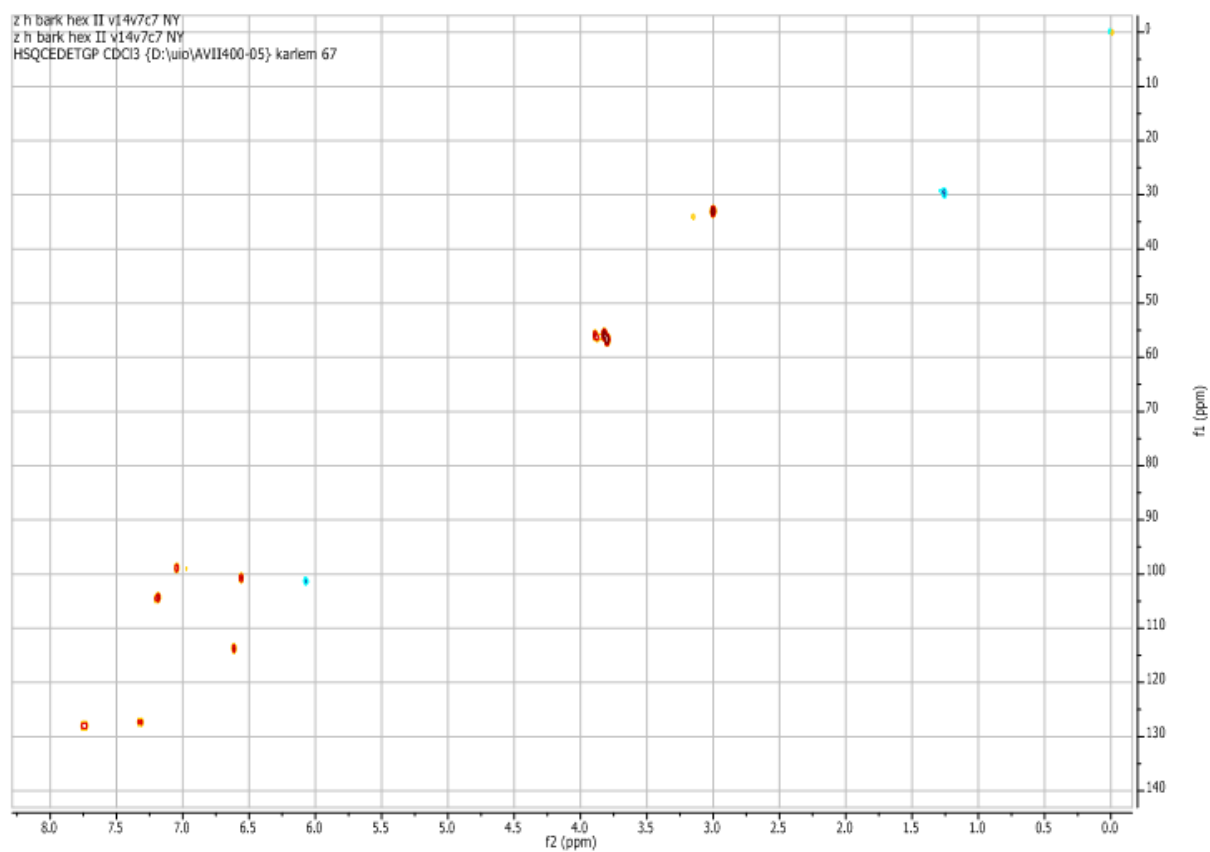
Vedlegg D. 1 H og ^{13}C (APT) NMR spektra av sesamin



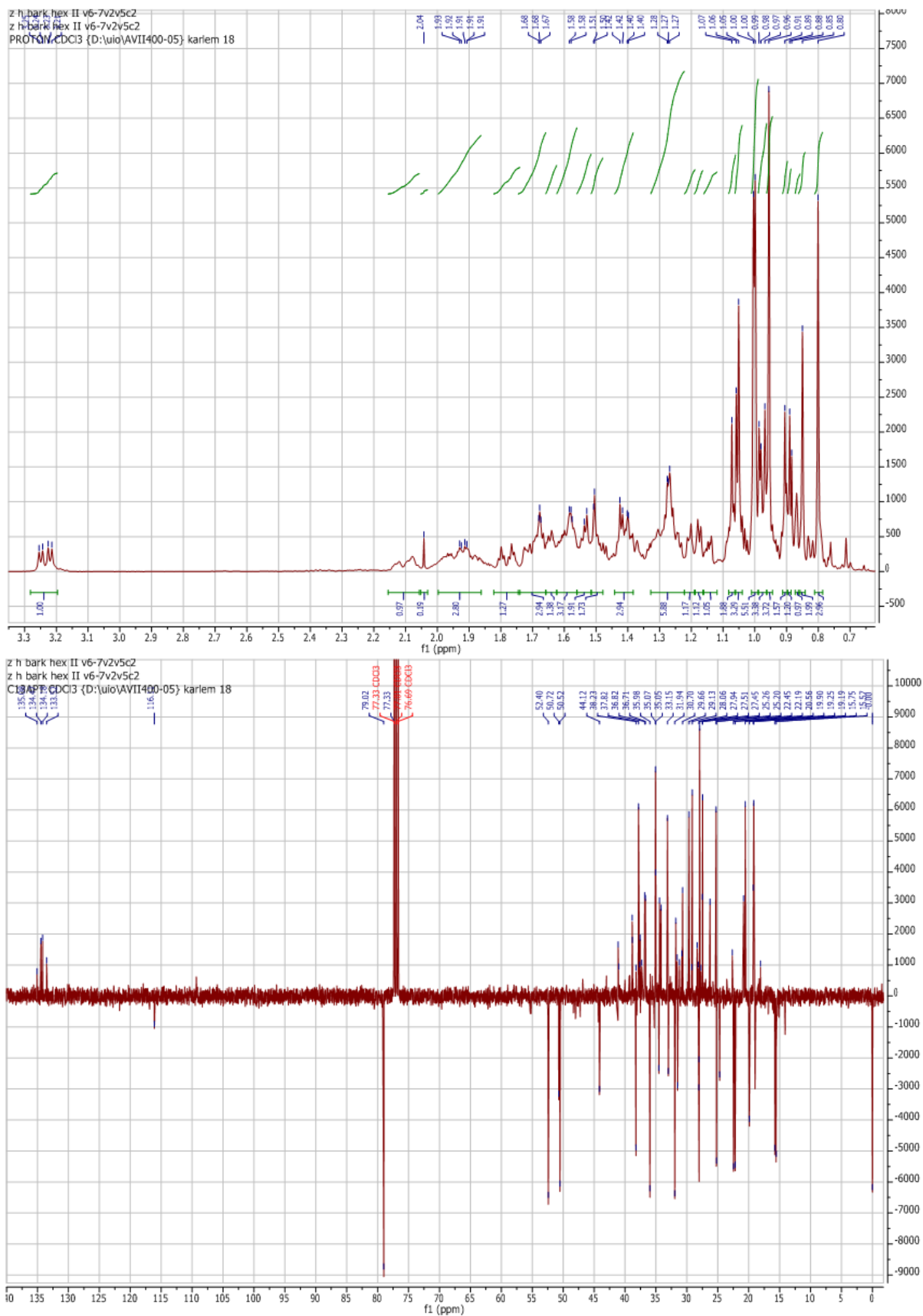
154



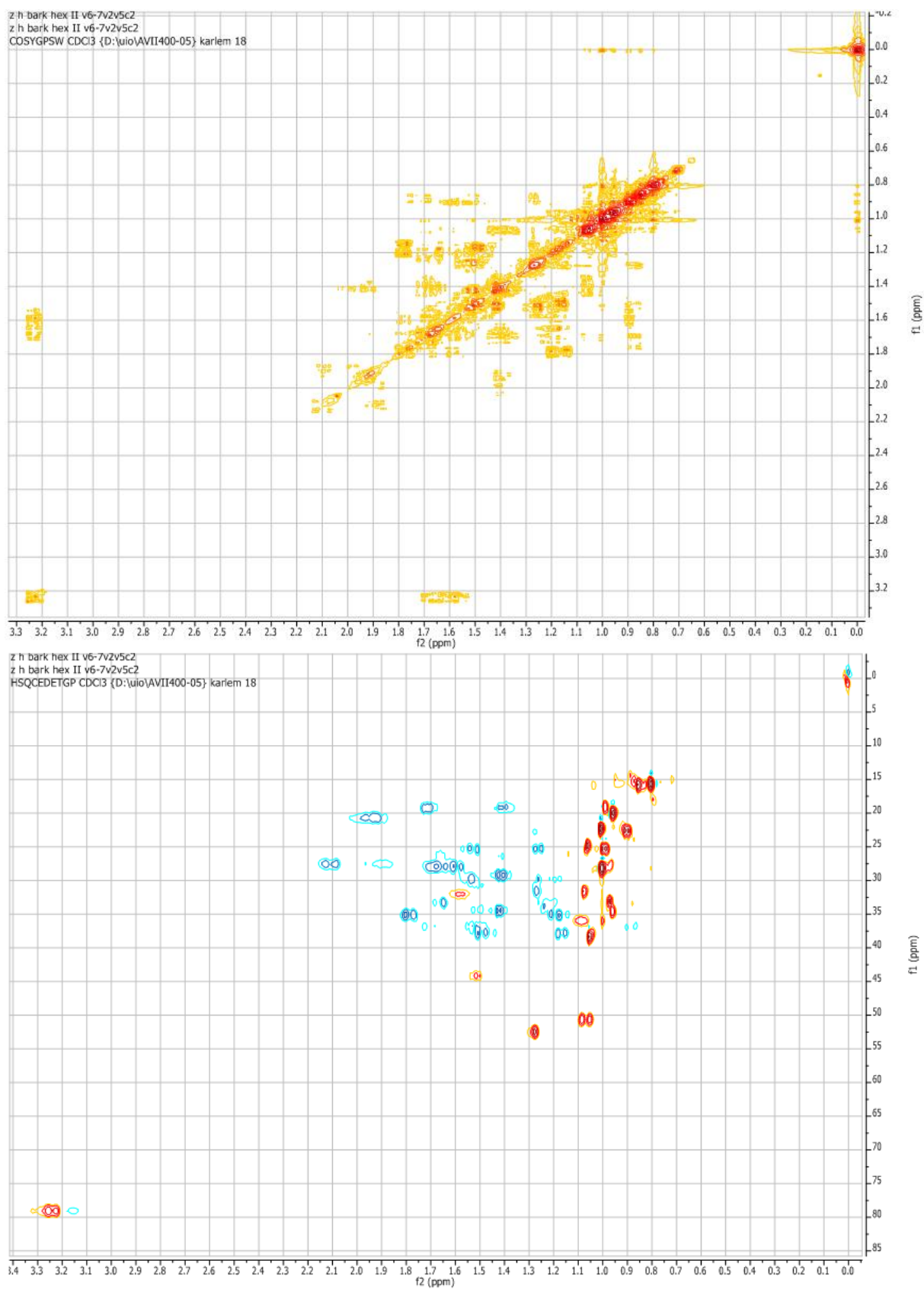
Vedlegg F-1. 1 H og ¹³C (APT) NMR spektra av isoarnottianamid



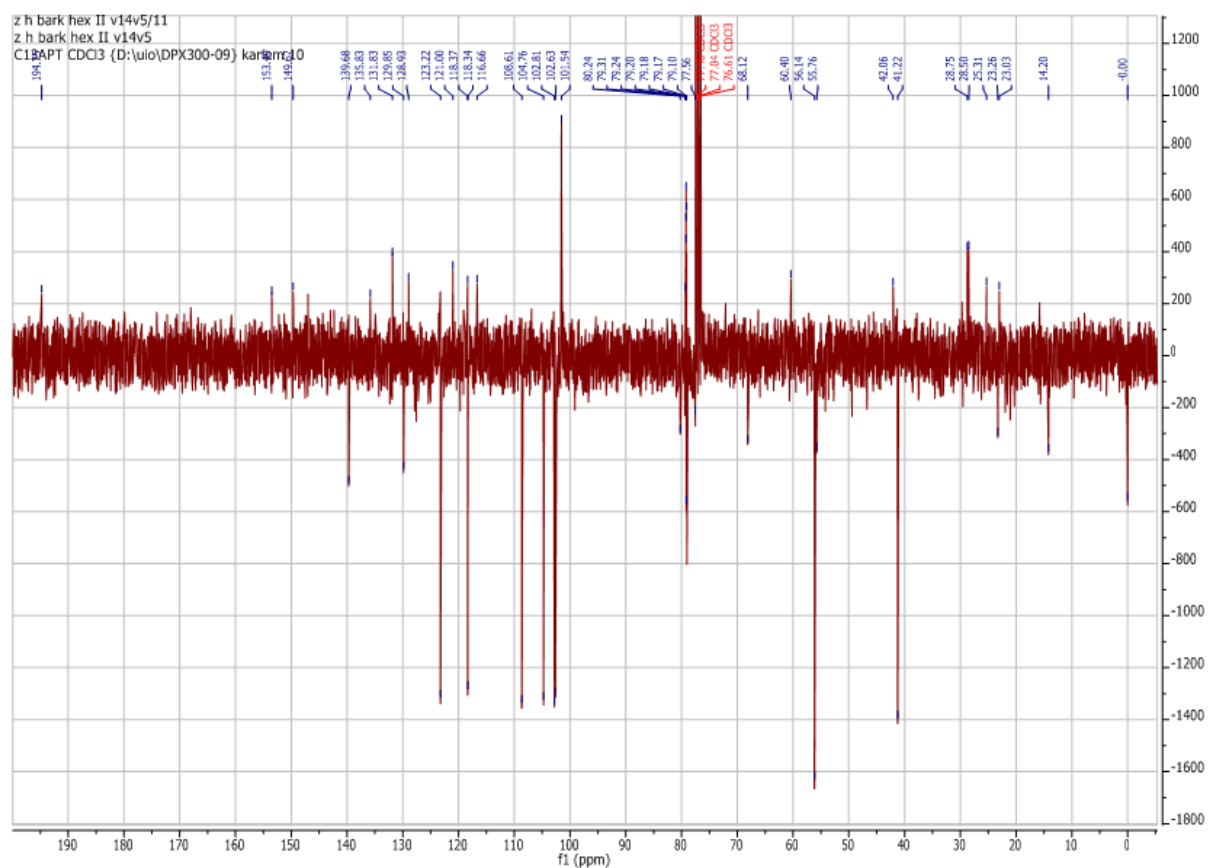
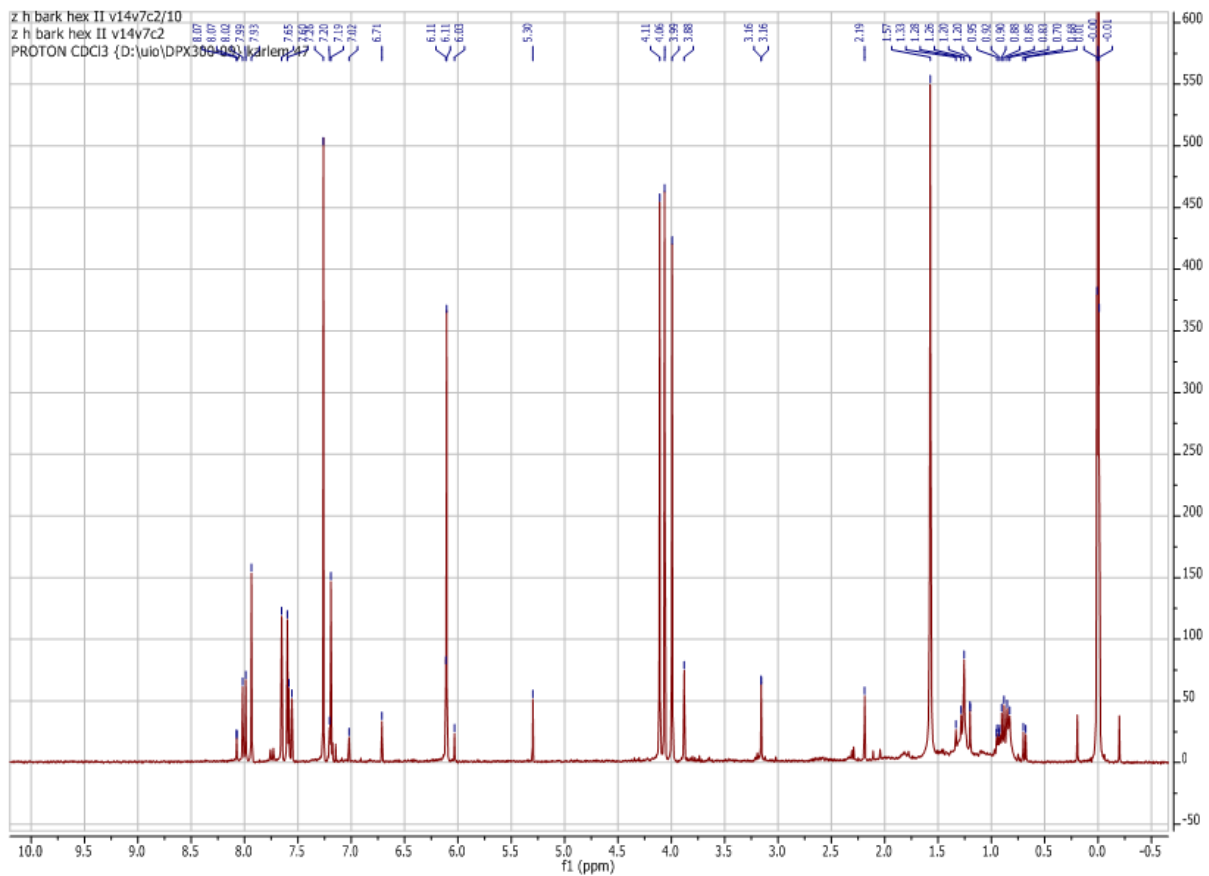
Vedlegg F-2. HSQC NMR spektrum av isoarnottianamid



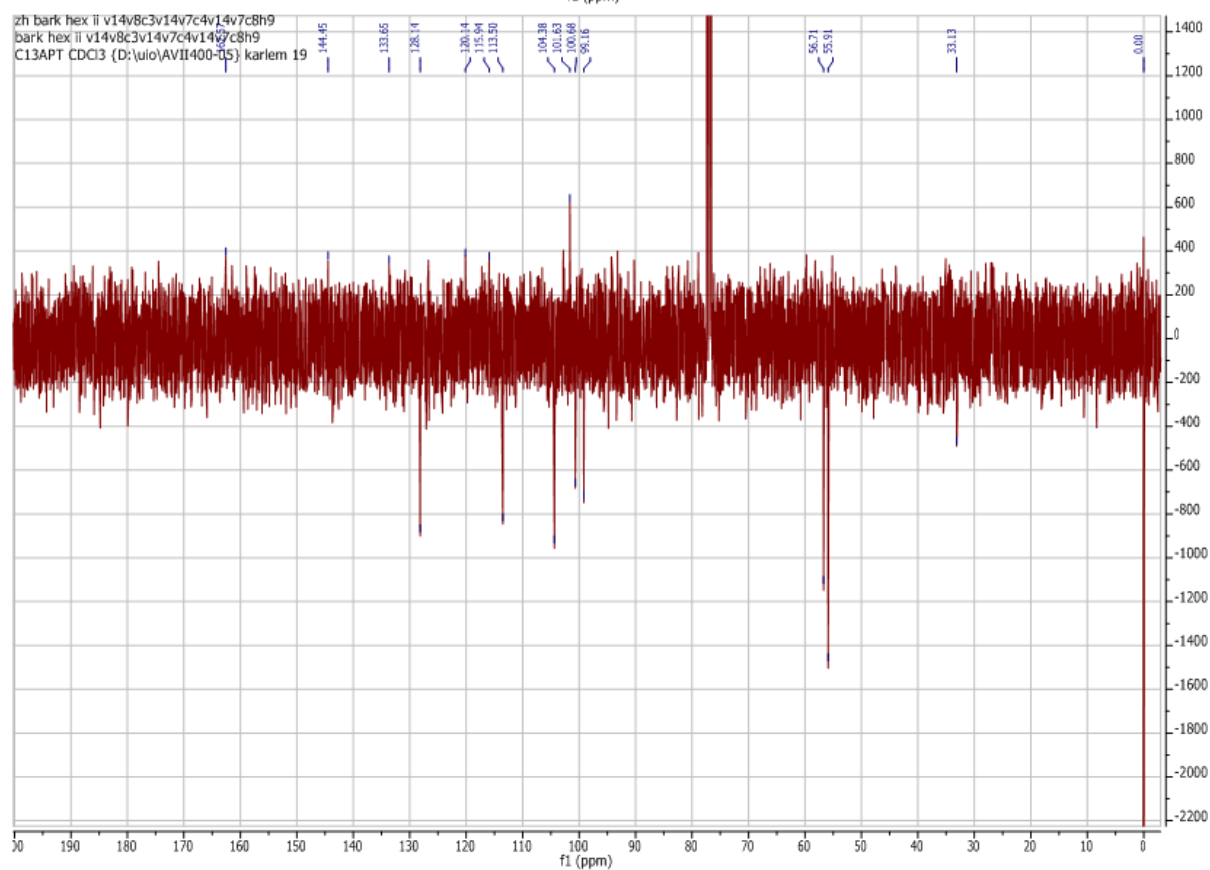
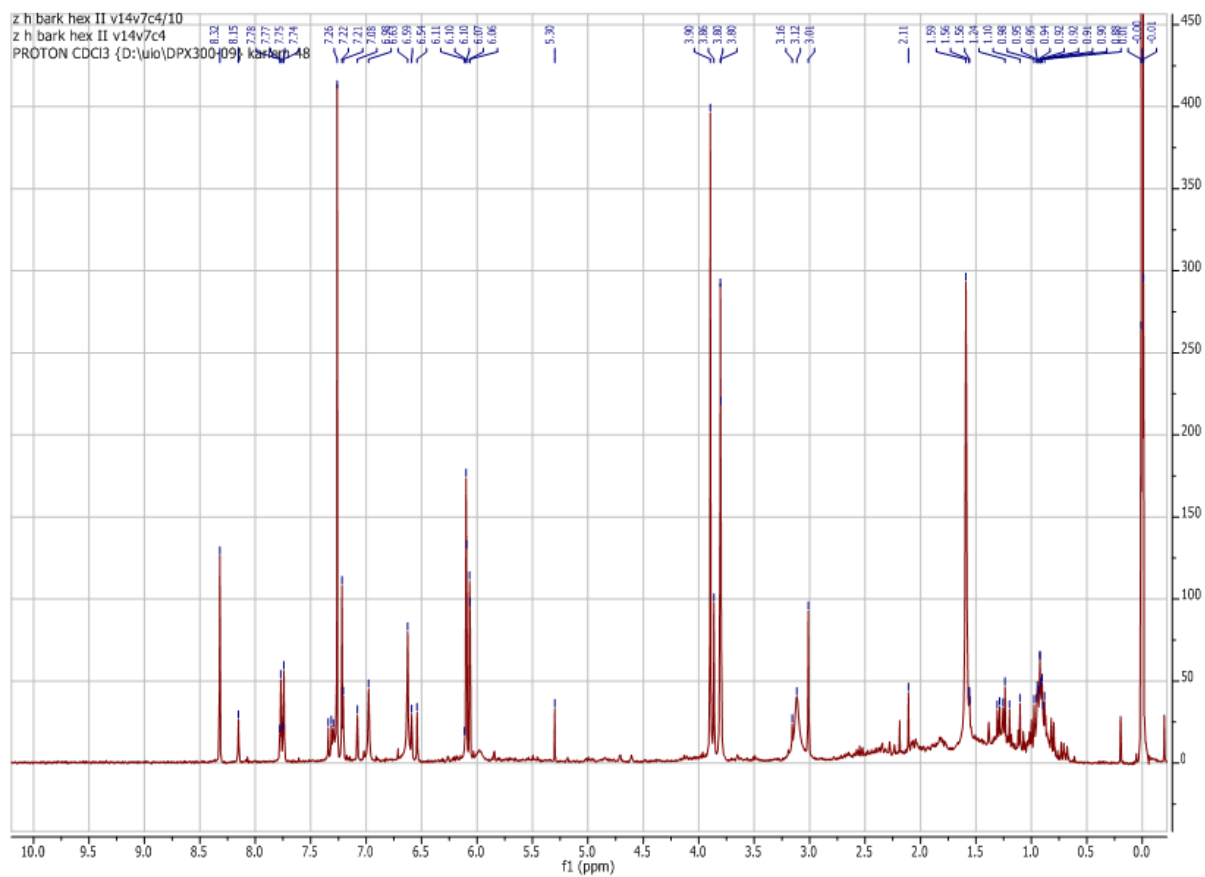
Vedlegg G-1. 1 H og ¹³C (APT) NMR spektra av isobauerenol



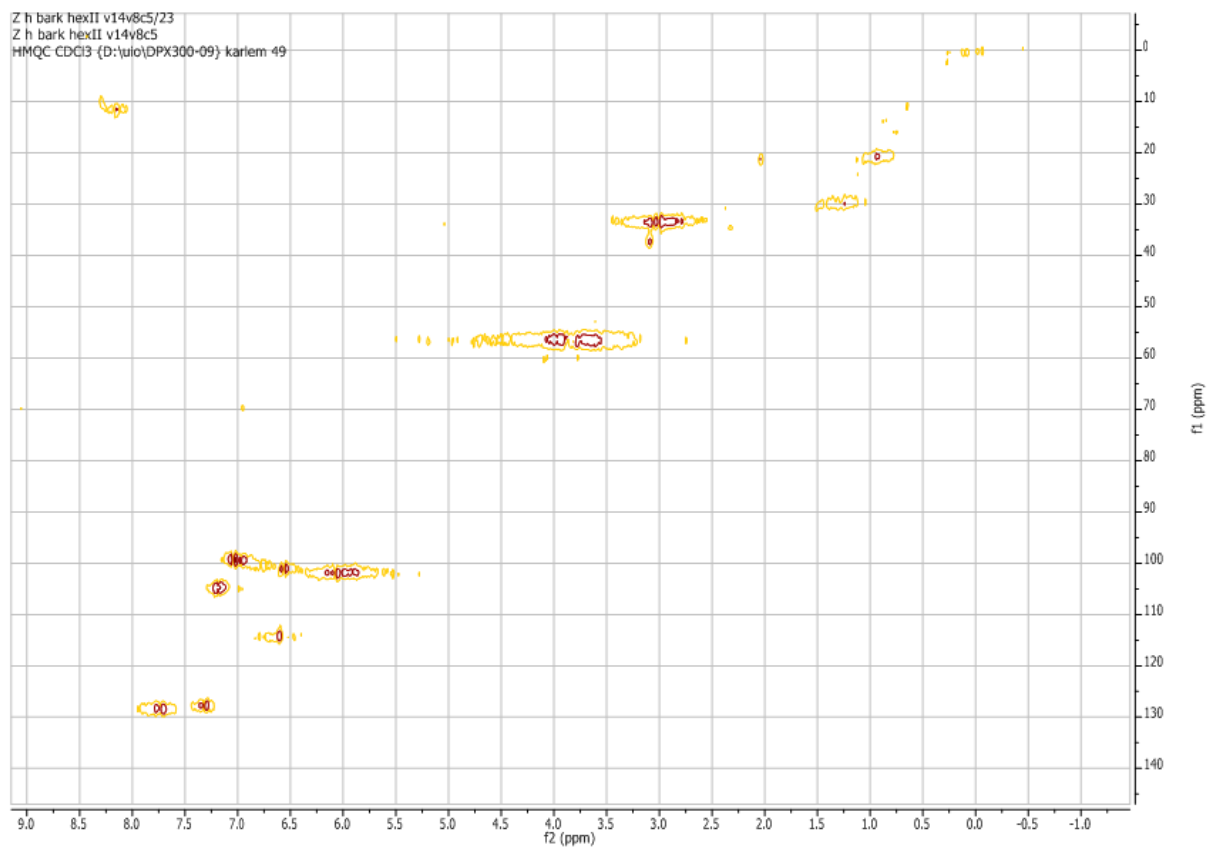
Vedlegg G-2. COSY og HSQC NMR spektra av isobauerenol



Vedlegg H. 1 H og ¹³C (APT) NMR spektra av rhoifolin B



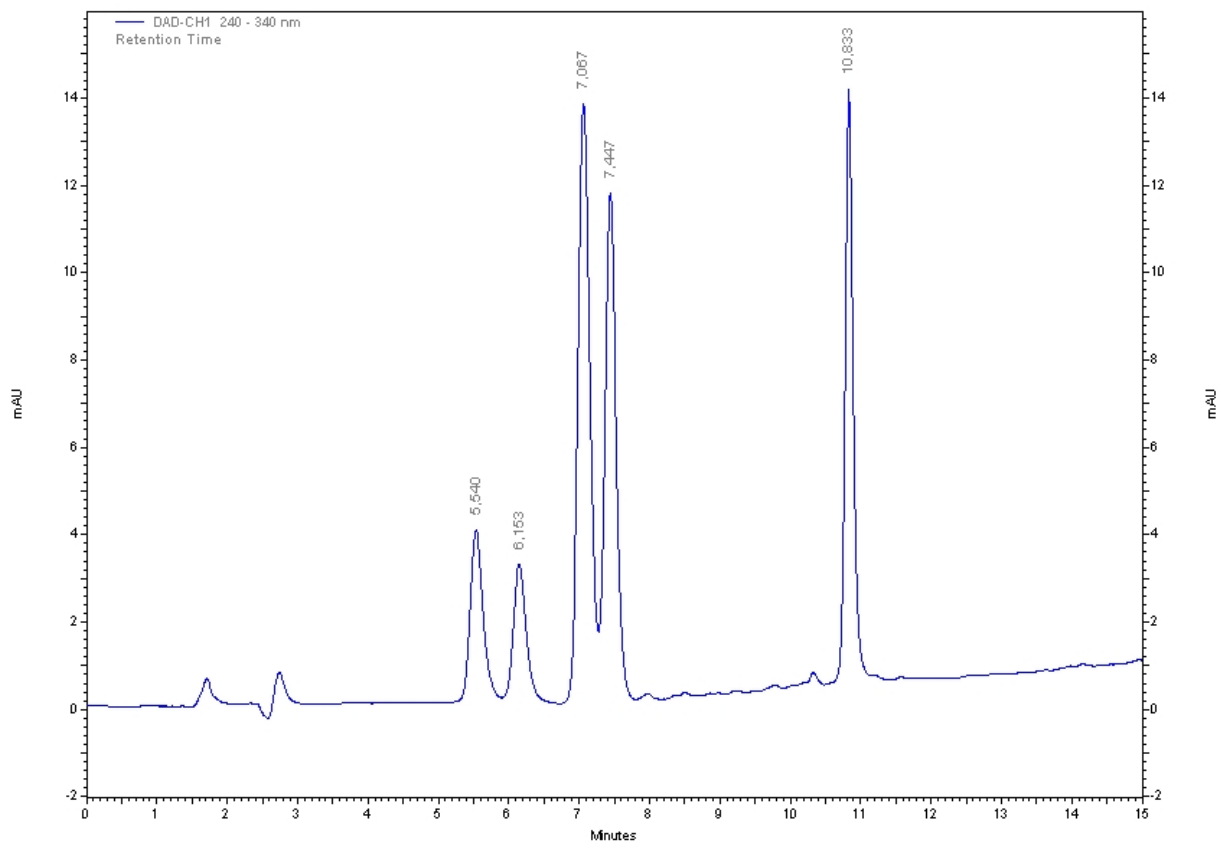
Vedlegg I-1. ¹H og ¹³C (APT) NMR spektra av turraeanthin A



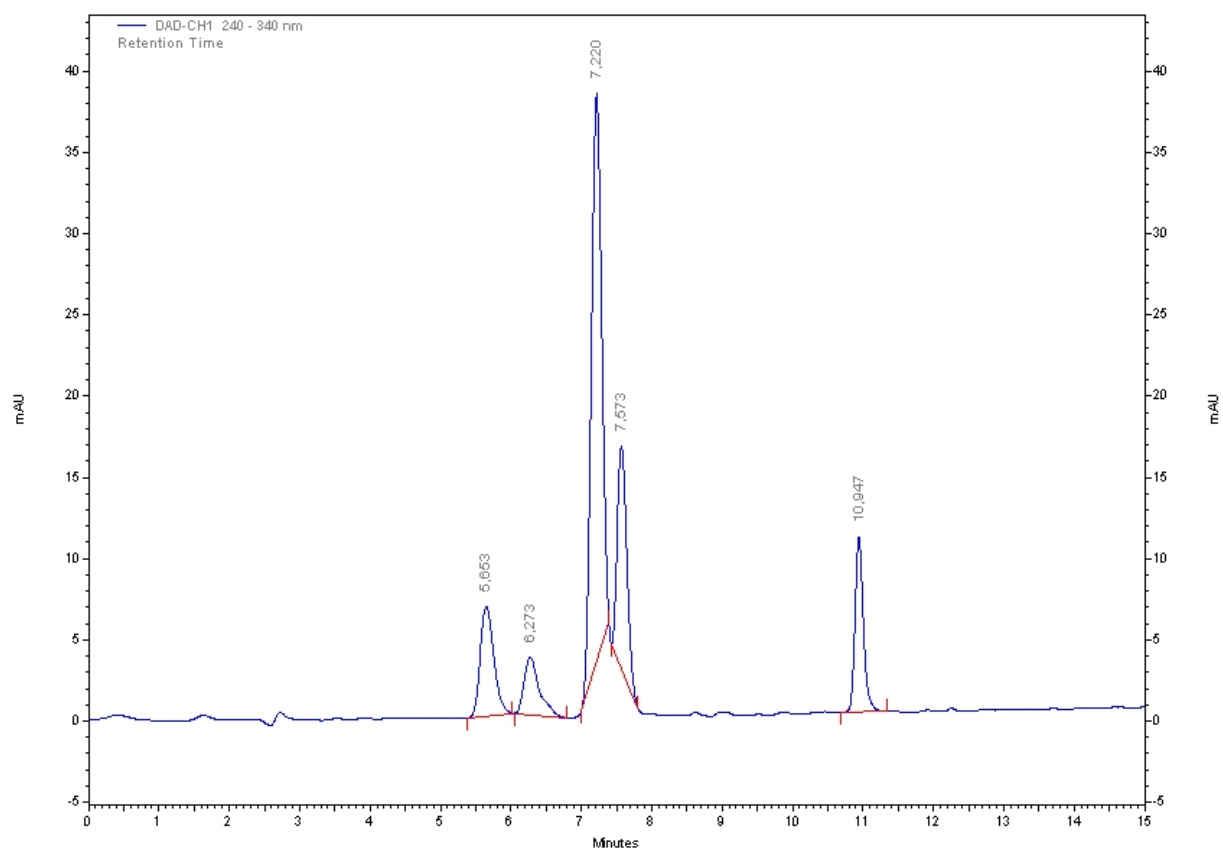
Vedlegg I-2. HSQC spektrum av turraeanthin A

9.4 Analytiske HPLC-kromatogrammer

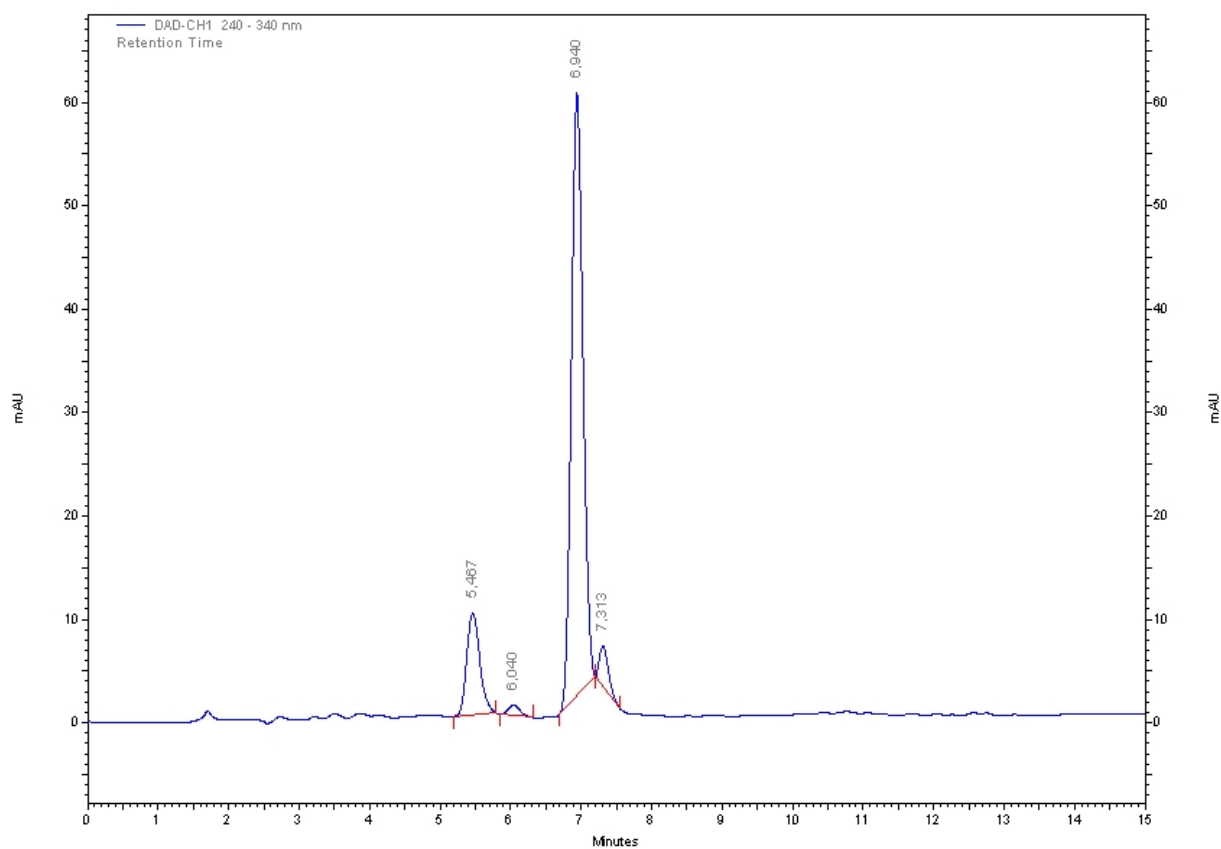
9.4.1 Fraksjon V3V9



9.4.2 Fraksjon V6-7V9K4



9.4.3 Fraksjon V14V7K4



Litteraturliste

1. USDA, N. *Zanthoxylum* L., pricklyash. 2014 [cited 2014 11.06]; Available from: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=ZANTH&display=31>.
2. Waterman, P.G., New combinations in *Zanthoxylum* L. . Taxon, 1975. **24**: p. 361-366.
3. Gilbert, G., Erythroxylaceae, Rutaceae, Simaroubaceae et Meliaceae Congolanae nova. Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles, 1958. **28**: p. 375-383.
4. Tafokou, R.B.J. *Zanthoxylum heitzii* (Aubrév. & Pellegr.) P.G.Waterman Protas 7(1) 2008 [cited 2014 12.06]; Available from: http://database.prota.org/PROTAhtml/Zanthoxylum%20heitzii_En.htm
5. Mikolo, B., Matos, L., Massamba, D., Mamonekene, V., and Miller, T., Extracts from the bark of *Fagara heitzii* (Aubr. et Pel.) (Rutaceae) tree are toxic to two weevils and the American cockroach. Entomological Research, 2009. **39**(6): p. 401-405.
6. Betti, J.L., An ethnobotanical study of medicinal plants among the Baka pygmies in the Dja biosphere reserve, Cameroon. African Study Monographs, 2004. **25**(1): p. 1-27.
7. Betti, J.L., Medicinal plants sold in Yaoundé markets, Cameroon. African study monographs, 2002. **23**(2): p. 47.
8. Nanfack, P., Cabral, B.N., Anatole, P.C., Joselyne, A.M., Bruno, M., and Jeanne, N.Y., The in vitro antisickling and antioxidant effects of aqueous extracts *Zanthoxylum heitzii* on sickle cell disorder. BMC Complementary and alternative medicine, 2013. **13**(1): p. 162.
9. Mengome, L.E., Akue, J.P., Souza, A., Feuya Tchoua, G.R., and Nsi Emvo, E., In vitro activities of plant extracts on human *Loa loa* isolates and cytotoxicity for eukaryotic cells. Parasitology research, 2010. **107**(3): p. 643-50.
10. Mbaze, L.M., Lado, J.A., Wansi, J.D., Shiao, T.C., Chiozem, D.D., Mesaik, M.A., Choudhary, M.I., Lacaille-Dubois, M.A., Wandji, J., Roy, R., and Sewald, N., Oxidative burst inhibitory and cytotoxic amides and lignans from the stem bark of *Fagara heitzii* (Rutaceae). Phytochemistry, 2009. **70**(11-12): p. 1442-7.
11. Ngouela, S., Tsamo, E., and Connolly, J.D., Lignans and other constituents of *Zanthoxylum heitzii*. Phytochemistry, 1994. **37**(3): p. 867-869.
12. Ahmad, S., Flindersine from *Fagara heitzii*. Journal of Natural Products, 1984. **47**(2): p. 391-392.
13. Bongui, J.B., Blanckaert, A., Elomri, A., and Seguin, E., Constituents of *Zanthoxylum heitzii* (Rutaceae). Biochemical systematics and ecology, 2005. **33**(8): p. 845-847.
14. Dzoyem, J.P., Guru, S.K., Pieme, C.A., Kuete, V., Sharma, A., Khan, I.A., Saxena, A.K., and Vishwakarma, R.A., Cytotoxic and antimicrobial activity of selected Cameroonian edible plants. BMC Complementary and alternative medicine, 2013. **13**(1): p. 78.
15. Bauman, R.W., Microbiology with diseases by taxonomy. 2007: Pearson Benjamin Cummings. 658-660.
16. Sand, O.S., Ø.V. and Haug, E., Menneskets fysiologi. 2003: Gyldendal Akademisk. 343.
17. Evensen, S.A. Sigdcelleanemi. [cited 2014 12.06]; Available from: <http://sml.snl.no/sigdcelleanemi>.

18. Mokondjimobe, E., Miantezila Basilua, J., Barkha, S., Dzeufiet, P., Chenal, H., Otsudi'andjeka, J., Bipolo, S., Besse, M., Mamadou, G., and Limas-Nzouzi, N., Fagaricine, a new immunorestorative phytomedicine from *Zanthoxylum heitzii*: Preclinical and multicenter cohort clinical studies based on HIV-infected patients in six countries. *Phytopharmacology*, 2012. **2**(1): p. 26-45.
19. Folkehelseinstituttet. Forebygging av malaria hos reisende. 2009 [cited 2014 12.06]; 2. utgave]. Available from: <http://www.fhi.no/dokumenter/a6a2bcb704.pdf>.
20. Rang, H.P.D., M.M Ritter, J.M Flower, R.J, Rang and Dale's pharmacology. 2007: Churchill Livingstone Elsevier. 702-709.
21. Klebe, G., Drug design: methodology, concepts, and mode-of-action. 2013: Springer London, Limited. 42.
22. Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell. T1.16.1 Malaria. 2013 [cited 2014 27.04]; Available from: <http://legemiddelhandboka.no/Terapi/2394/?ids=2395#i2395>.
23. Folkehelseinstituttet. Smittevernbooka, Malaria. 2014 [cited 2014 12.06]; Available from: <http://www.fhi.no/artikler/?id=82817>
24. CIA. The World Factbook. [cited 2014 12.06]; Available from: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/xx.html>.
25. WHO. Malaria. 2014 [cited 2014 27.04]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>.
26. WHO. World Malaria Report 2013. 2013 [cited 2014 27.04]; Available from: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/wmr2013_no_pr_ofiles.pdf?ua=1.
27. Lindsay, S., Ansell, J., Selman, C., Cox, V., Hamilton, K., and Walraven, G., Effect of pregnancy on exposure to malaria mosquitoes. *Lancet*, 2000. **355**(9219): p. 1972.
28. BMJ. British Medical Journal, Malaria infection, Primary prevention. Best Practice [cited 2014 12.06.]; Available from: <http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/161/prevention/primary.html>.
29. Clements, A.N., The biology of MOSQUITOES. Vol. 1. 2000: CABI Publishing. xiii-xxii.
30. Hågvær, E.B., Det zoologiske mangfoldet, Dyregruppernes systematikk, bygning og levevis. 3.utgave ed. 2010: Universitetsforlaget. 180, 186, 210-211.
31. Malaria Atlas Project, Mosquito Malaria Vectors. [cited 2014 12.06.]; Available from: <http://www.map.ox.ac.uk/explore/mosquito-malaria-vectors/>.
32. Sundby, R., Insekter og deres mangfoldige verden. 1995: Landbruksforlaget. 123-124.
33. McGavin, G.C., Insekter og edderkoppdyr. 2006: DAMM & Søn A.S Natur Egmont 124.
34. McGavin, G.C., INSEKTER Over 300 familier av inekter, edderkopper og andre leddyr. 2000: N.W. DAMM & Søn A.S. 138.
35. Hickman, C.P., Animal Diversity, Fifth edition. McGraw-Hill. 270.
36. WHO. Mosquitos and other biting Diptera. [cited 2014 12.06]; Available from: http://www.who.int/water_sanitation_health/resources/vector007to28.pdf.
37. Malaria Atlas Project, Mosquito Malaria Vectors. [cited 2014 12.05]; Available from: http://www.map.ox.ac.uk/explore/mosquito-malaria-vectors/about_bionomics/.
38. EOL. Encyclopedia of life, *Artemia salina*, Brine shrimp. [cited 2014 12.06]; Available from: <http://eol.org/pages/1020243/details>.
39. Asem, A., Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia lake, Iran. *Journal of Biological Research – Thessaloniki* 9, 2008: p. 113-114.
40. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Legemiddelanalyse. 2010: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke A.S. 152-161.

41. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Legemiddelanalyse. 2010: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke A.S. 162-169
42. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Legemiddelanalyse. 2010: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke A.S. 173-189.
43. Research, H. The chromatotron. [cited 2014 13.06]; Available from: <http://www.harrisonresearch.com/chromatotron/specs.html>.
44. Greibrokk, T., Karlsen, J., Rasmussen, K.E., Kromatografi. 1992: Universitetsforlaget. 223-230.
45. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E., Legemiddelanalyse. 2010: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke A.S. 190-199.
46. Le, N.T., Malterud, K.E., Diallo, D., Paulsen, B.S., Nergård, C.S., and Wangensteen, H., Bioactive polyphenols in *Ximenia americana* and the traditional use among Malian healers. Journal of ethnopharmacology, 2012. **139**(3): p. 858-862.
47. Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., and McLaughlin, J.L., Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta medica, 1982. **45**(5): p. 31-34.
48. WHO, Report of the fifteenth WHOPES working group meeting. 2012, Geneva: World Health Organization.
49. IRD, Protocoles des tests insecticides, L.L. UMR Mivegec, Editor.: Montpellier, Frankrike. p. 1-20.
50. WHO, Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. Genève. p. 39.
51. Klibak, H. CSUMB Bio 242-L Plant and animal form and function lab. 2009 [cited 2014 13.06]; Available from: http://science.csumb.edu/~hkibak/242L_web/.
52. IRD, Breeding techniques for *Aedes*, *Anopheles* & *Culex* mosquitoes, L.L. UMR Mivegec, Editor.: Montpellier, Frankrike. p. 41.
53. Lee, K., Lee, S., and Choi, K., Sesquiterpenes from *Syneilesis palmata* and their cytotoxicity against human cancer cell lines in vitro. Archives of pharmacal research, 2005. **28**(3): p. 280-284.
54. Consolacion, Y.R., A new furanoid diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. Chemical & pharmaceutical bulletin, 2003. **51**(10): p. 1208.
55. Malterud, K.E., Mikolo, B., Corbel, V., Chandre, F., Patcharawan, S., Wangensteen, H., Paulsen, B.S., Overgaard, H.J., Anti-mosquito activity of *Zanthoxylum heitzii*, a Congolese medicinal plant, in Foredrag, Nordic Natural Product conference. (2013): Åbo, Finland. p. **Sammendrag av innleggene, s. 29**.
56. de Moura, N., de Moura, H., Ribeiro, E.C.S., Machado, E., Ethur, N., and Zanatta, A., Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. Phytochemistry, 1997. **46**(8): p. 1443-1446.
57. Toyoda, K., Yaoita, Y., Kikuchi, M., Chemical constituents of the genus *Ligularia* plants. II. Triterpenoids from the leaves and roots of *Ligularia stenocephala* Matsum. et Koidz. Journal of Tohoku Pharmaceutical University 2005. **52**: p. 27-32.
58. Liu, Y.F., Yang, X.W., and Wu, B., Studies on chemical constituents in the buds of *Tussilago farfara*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2007. **32**(22): p. 2378-81.
59. Oh, J., Oh, I., Hwang, D.K., S., Kang, T., Jang, S., Lee, M., and Na, Anti-listerial compounds from *Asari Radix*. Archives of pharmacal research, 2010. **33**(9): p. 1339-1345.
60. Gonzaga, W.A., Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. Planta medica, 2003. **69**(4): p. 371.

61. Yang, C., Yang, M., Cheng, S., Lee, C., Yang, H., Chang, I., and Chen, Secondary metabolites and cytotoxic activities from the stem bark of *Zanthoxylum nitidum*. Chemistry & biodiversity, 2009. **6**(6): p. 846-857.
62. Vardamides, J.C., Dongmo, A.B., Meyer, M., Ndom, J.C., Azebaze, A.G., Zounda, M.R., Sielinou, V.T., Ndemangou, B., Nkengfack, A.E., Ngando, T.M., and Fomum, Z.T., Alkaloids from the stem bark of *Turraeanthus africanus* (Meliaceae). Chem Pharm Bull (Tokyo), 2006. **54**(7): p. 1034-6.
63. Talontsi, F., Talontsi, J., Matasyoh, R., Ngoumfo, R., and Chepkorir, R., Mosquito larvicidal activity of alkaloids from *Zanthoxylum lemairei* against the malaria vector *Anopheles gambiae*. Pesticide biochemistry and physiology, 2011. **99**(1): p. 82-85.
64. Zhang, H.Z., Wang, Y.F., Zhang, M.L., Dong, M., Huo, C.H., Sauriol, F., Shi, Q.W., Gu, Y.C., Wang, H.L., and Kiyota, H., A new alkaloid taxane composed of two N-formyl rotamers from the rooted cuttings of *Taxus canadensis*. Chemistry of Natural Compounds, 2013. **48**(6): p. 1035-1038.
65. Wang, C., Wang, K., Yang, H., Zhang, J., Cao, R., Fang, Z., Liu, S., Du, Y., Wang, Z., Deng, L., and Zhou, L., Components and insecticidal activity against the maize weevils of *Zanthoxylum schinifolium* fruits and leaves. Molecules, 2011. **16**(4): p. 3077-3088.
66. Cai, M., Cai, Y., Zhou, X., Wang, R., Li, X., Liao, X., and Ding, L., Rapid structural characterization of isomeric benzo[c]phenanthridine alkaloids from the roots of *Zanthoxylum nitidum* by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry, 2007. **21**(12): p. 1931-1936.
67. Gaya, C.H., Kawaka, J.F., Muchugi, A., Ngeranwa, J.J., Variation of alkaloids in the Kenyan *Zanthoxylum gillettii* (De Wild Waterman). African Journal of Plant Science, 2013. **7**: p. 438-444.
68. Biavatti, M.W., Vieira, P.C., da Silva, M.F.G., Fernandes, J.B., Albuquerque, S., Magalhaes, C.M., and Pagnocca, F.C., Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species. Phytomedicine, 2001. **8**(2): p. 121-4.
69. He, W., Van Puyvelde, L., De Kimpe, N., Verbruggen, L., Anthonissen, K., Van der Flaas, M., Bosselaers, J., Mathenge, S.G., and Mudida, F.P., Chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum usambarense*. Phytotherapy research, 2002. **16**(1): p. 66-70.
70. Steyn, P.S., Van den Heerver, J.P., Vosloo, H.C.M., and Ackerman, L.G.J., Biologically active substances from *Zanthoxylum capense* (thumb.) Harv. 1998.
71. Arruda, M.S.P., Fernandes, J.B., Dasilva, M.F.D.F., Vieira, P.C., and Pirani, J.R., Quinolone alkaloids from *Zanthoxylum-Acutifolium*. Phytochemistry, 1992. **31**(10): p. 3617-3619.
72. Hu, J., Shi, X., Chen, J., Mao, X., Zhu, L., Yu, L., and Shi, J., Alkaloids from *Toddalia asiatica* and their cytotoxic, antimicrobial and antifungal activities. Food Chemistry, 2014. **148**(0): p. 437-444.
73. Ishii, H., Ishikawa, T., Lu, S., and Chen, I., Studies on the chemical constituents of Rutaceous plants. XXXI. The chemical constituents of *Xanthoxylum cuspidatum* Champ. (*Fagara cuspidata* Engl.) (author's transl). Yakugaku Zasshi, 1976. **96**(12): p. 1458-67.
74. Hsiao, J.J. and Chiang, H.C., Lignans from the wood of *Aralia-Bipinnata*. Phytochemistry, 1995. **39**(4): p. 899-902.
75. Ngoumfo, R.M., Jouda, J.B., Mouafo, F.T., Komguem, J., Mbazoa, C.D., Shiao, T.C., Choudhary, M.I., Laatsch, H., Legault, J., Pichette, A., and Roy, R., In vitro cytotoxic

- activity of isolated acridones alkaloids from *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr. Bioorganic and medicinal chemistry, 2010. **18**(10): p. 3601-5.
76. Gohari, A.R., Hadjiakhoondi, A., Sadat, S.E., Saidnia, S., Shafiee, A. , Cytotoxic terpenoids from *Satureja macrantha* C.A. Mey. Daru 13, 177-181., 2005: p. 177-181.
 77. Huang, J.M., Brine shrimp lethality test active constituents and new highly oxygenated seco-prezizaane-type sesquiterpenes from *Illicium merrilliamum*. chemical & pharmaceutical bulletin, 2002. **50**(1): p. 133.
 78. Spatafora, C. and Tringali, C., Bioactive metabolites from the bark of *Fagara macrophylla*. Phytochemical analysis, 1997. **8**(3): p. 139-142.
 79. Bossou, A.D., Mangelinckx, S., Yedomonhan, H., Boko, P.M., Akogbeto, M.C., De Kimpe, N., Avlessi, F., and Sohounhloue, D.C., Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). Parasites & Vectors, 2013. **6**(1): p. 337.
 80. Park, I.K., Park, S.G., Lee, S.C., Shin, J.D., Park, Y.J., and Ahn, Larvicidal activity of isobutylamides identified in *Piper nigrum* fruits against three mosquito species. Journal of agricultural and food chemistry, 2002. **50**(7): p. 1866-1870.
 81. Baraza, L., Baraza, C., Joseph, J.J.E., Munissi, M.H.H., Nkunya, N., Arnold, A., Porzel, L., and Wessjohann, L., Antifungal rosane diterpenes and other constituents of *Hugonia castaneifolia*. Phytochemistry, 2008. **69**(1): p. 200-205.
 82. Perumalsamy, H., Perumalsamy, K., Chang, C., Park, Y.J., and Ahn, Larvicidal activity of *Asarum heterotropoides* root constituents against insecticide - susceptible and - resistant *Culex pipiens pallens* and *Aedes aegypti* and *Ochlerotatus togoi*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(18): p. 10001-10006.